

UNIVERSITE DE LILLE
École doctorale Biologie-Santé de Lille (ED446)

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE BIOLOGIE – SCIENCE DE LA VIE ET DE LA SANTE DE
L'UNIVERSITÉ DE LILLE

**La phosphorylation oxydative mitochondriale des blastes :
biomarqueur prédictif de la survie des patients atteints de
leucémies aiguës myéloïdes**

Présentée et soutenue publiquement le 17 décembre 2021 à 14h00
au Pôle Recherche par **Quentin FOVEZ**

JURY COMPOSE DES MEMBRES :

Madame le Docteur Catherine BRENNER	<i>rapporteur</i>
Monsieur le Docteur Nicolas CHAPUIS	<i>rapporteur</i>
Madame le Docteur Anne DEVIN	<i>examinateur</i>
Monsieur le Docteur Jean-Emmanuel SARRY	<i>examinateur</i>
Monsieur le Professeur Bruno QUESNEL	<i>examinateur</i>
Monsieur le Professeur Philippe MARCHETTI	<i>membre invité</i>

DIRECTEUR DE THESE :

Monsieur le **Docteur Jérôme KLUZA**

*Travail réalisé au sein de l'UMR9020 (CNRS) - U1277 (INSERM) - Cancer
Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies – ONCOLILLE*

Equipe : Facteurs de persistance des cellules leucémiques

*« Ars longa,
vita brevis,
occasio praeceps,
experimentum periculosum,
iudicium difficile. »*

*« La vie est courte,
la science interminable,
l'opportunité fugace,
l'expérimentation faillible,
le jugement difficile. »*

Hippocrate (Aphorismes, sect. I, no. 1)

Je dédie cette thèse à tous ceux qui, un jour, ont cru en moi.

Table des matières

Résumé	8
Abstract	10
Abréviations	12
Remerciements	14
Productions scientifiques	21
Introduction	23
1. Les Leucémies Aigues Myéloïdes.....	23
1.1 Etiologie.....	23
1.2 Signes cliniques.....	24
1.3 Hiérarchie hématopoïétique des LAM.....	24
1.4 Démarche diagnostique.....	26
1.4.1 La Numération Formule Sanguine (NFS).....	26
1.4.2 Le frottis médullaire.....	26
1.4.3 L'étude cytochimique.....	27
1.4.4 L'immunophénotypage.....	27
1.4.5 La cytogénétique (conventionnelle ou hybridation in situ).....	28
1.4.6 La biologie moléculaire.....	28
1.4.7 La cryoconservation de blastes et de matériel cellulaire.....	29
1.5 La classification FAB (French-American-British).....	29
1.6 Classification OMS 2016.....	29
1.7 Biomarqueur pronostique et prédictif dans les LAM.....	30
1.7.1 Facteurs de risque liés au patient.....	31
1.7.2 Anomalies cytogénétiques.....	31
1.7.3 Anomalies moléculaires.....	33
1.7.4 Classification European LeukemiaNet.....	42
1.8 Prise en charge thérapeutique des LAM.....	43
1.8.1 La phase d'induction.....	44
1.8.2 La phase de consolidation.....	44
1.8.3 Prise en charge des formes complexes.....	46
1.9 Rôle du métabolisme mitochondrial dans la résistance aux traitements.....	50
2. Le métabolisme énergétique mitochondrial des LAM.....	51
2.1 Organisation et dynamique mitochondriale.....	51
2.2 Métabolisme énergétique des cellules hématopoïétiques saines ou leucémiques.....	53
2.2.1 Métabolisme énergétique des cellules hématopoïétiques saines.....	53
2.2.2 Métabolisme énergétique des cellules leucémiques.....	56

2.3	Acteurs moléculaires du métabolisme énergétique des LAM.....	58
2.3.1	Le cycle de Krebs.....	58
2.3.2	La phosphorylation oxydative mitochondriale.....	66
2.3.3	La FoF1 ATP synthase.....	70
2.4	Organisation des complexes de la chaîne respiratoire.....	71
2.5	Découplage du flux de protons entre la chaîne respiratoire et la FoF1 ATP-synthase.....	73
2.5.1	Découplage physiologique entre la chaîne respiratoire et la FoF1 ATP-synthase.....	73
2.5.2	Découplage expérimental entre la chaîne respiratoire et la FoF1 ATP-synthase.....	74
2.6	Mesure de la consommation d'oxygène mitochondriale comme marqueur de l'activité de la phosphorylation oxydative dans les LAM.....	75
2.6.1	Les technologies d'évaluation de la consommation d'oxygène mitochondriale.....	75
2.6.2	Etat de l'art de la mesure de la consommation d'oxygène mitochondriale dans les LAM	77
	Problématique.....	78
	Résultats.....	79
	Partie I : Clinically relevant oxygraphic assay to assess mitochondrial energy metabolism in acute myeloid leukemia patients.....	79
	Partie II : Mitochondrial spare reserve capacity : a new predictive metabolic biomarker for aggressiveness of acute myeloid leukemia.....	101
	Discussion Générale.....	142
	Perspectives.....	150
	Conclusion générale.....	154
	Bibliographie.....	155
	Annexes.....	171
	<i>Annexe 1 : Revue - Mitochondrial spare respiratory capacity: Mechanisms, regulation, and significance in non-transformed and cancer cells.....</i>	<i>171</i>
	<i>Annexe 2 : Résultats de métabolomique avec l'[U13C]-Glutamine.....</i>	<i>191</i>
	<i>Annexe 3 : Relation entre les composantes de la consommation d'oxygène, de l'activité glycolytique, de l'âge et du pourcentage des blastes et la survie des patients.....</i>	<i>192</i>
	<i>Annexe 4 : Article - ANTIMETABOLIC COOPERATIVITY WITH THE CLINICALLY-APPROVED L-ASPARAGINASE AND TYROSINE KINASE INHIBITORS TO ERADICATE CML STEM CELLS.....</i>	<i>195</i>

Résumé

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) constituent un ensemble d'hémopathies malignes caractérisées par l'expansion clonale dans la moelle osseuse de précurseurs de cellules sanguines bloqués à un stade précoce de leur différenciation, les blastes. Le diagnostic et le suivi de la maladie reposent sur différents examens biologiques et biochimiques des blastes du sang et de la moelle osseuse. La faible survie observée dans les LAM, 24% 5 ans après le diagnostic, s'explique entre-autre par le fait que même si deux tiers des patients répondent initialement au traitement, la majorité d'entre eux finiront par rechuter. L'orientation du choix thérapeutique repose sur l'évaluation de critères cytogénétiques et moléculaires qui conduisent à la classification en groupes pronostiques identifiés selon les recommandations de l'ELN. Cependant cette classification présente des limites. Pour améliorer sa prédictivité, de nouveaux biomarqueurs complémentaires doivent être identifiés et caractérisés. Au cours de cette thèse, nous avons dans un premier temps développé une méthodologie robuste et fiable pour mesurer la consommation d'oxygène de cellules leucémiques de patients atteints de LAM afin d'évaluer les différents états de la phosphorylation oxydative mitochondriale comme potentiel biomarqueur fonctionnel des LAM. Puis nous avons appliqué cette méthodologie pour mesurer les différents paramètres métaboliques des blastes issues du sang de 58 patients atteints de LAM isolées au moment du diagnostic.

Nous avons d'abord développé un protocole pour mesurer, à l'aide du Seahorse XFe24, les différents états de la consommation d'oxygène mitochondriale de blastes isolés de la moelle ou du sang. Nous avons montré qu'il était possible de mesurer le métabolisme énergétique de ces cellules directement après le prélèvement, après 18 heures de cultures ou après la mise en culture suite à leur cryoconservation. Ces protocoles ont été développés afin de mesurer : la consommation d'oxygène mitochondriale (couplée ou non à la synthèse d'ATP) et la capacité de réserve respiratoire (SRC) qui correspond à la capacité des cellules à accélérer la chaîne respiratoire après exposition au protonophore FCCP.

A partir d'une étude de cohorte prospective (58 patients), nous avons évalué les différents états de la consommation d'oxygène mitochondriale de blastes issues de sang de patients atteints de LAM. Les analyses biostatistiques, basées sur le calcul du risque relatif instantané (hazard ratio, HR), ont déterminé que SRC était significativement corrélée à la survie des patients. Après discrétisation de la SRC, nous avons établi un seuil distinguant deux groupes de patients. Les patients présentant des blastes avec une SRC supérieure à $75 \text{ pmol d'O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ présentent une survie significativement plus élevée que les patients avec des blastes dont la SRC est inférieure à ce seuil.

Nous avons caractérisé les événements biochimiques associés à l'accélération de la chaîne respiratoire à partir de différentes lignées de LAM ou de blastes issus de patients. En utilisant des inhibiteurs pharmacologiques (BPTES, UK5099 et Etomoxir), des approches d'ARN interférence (knock-down MPC2) et des analyses de métabolomiques (après incubation avec de l'[U13C]-Glucose ou de l'[U13C]-Glutamine), nous avons démontré que l'oxydation du pyruvate via la pyruvate déshydrogénase était une voie majeure activée durant l'accélération de l'activité de la chaîne respiratoire induite par le FCCP.

En conclusion, nous avons démontré qu'il existait une hétérogénéité du métabolisme oxydatif des blastes issues du sang de patients atteints de LAM et que la SRC permettait de distinguer deux groupes de patients dont la survie est significativement différente. Ces résultats établissent une base méthodologique solide utilisable en clinique et montrent l'intérêt de la SRC en tant que potentiel biomarqueur pour compléter les biomarqueurs actuels utilisés pour établir la classification ELN

Abstract

Acute myeloid leukemia (AML) is a group of malignant hemopathies characterized by the clonal expansion in the bone marrow of blood cell precursors blocked at an early stage of differentiation, leukemic blasts. Diagnosis and monitoring of the disease are based on various biological and biochemical examinations of blood and bone marrow blasts. AML are particularly aggressive hemopathies with a 5-year survival rate of 24%. One of the reasons for this poor survival is the fact that even if two-thirds of patients initially respond to treatment, the majority of them will eventually relapse. Currently, the orientation of the therapeutic choice is based on the evaluation of cytogenetic and molecular criteria which lead to the classification into prognostic groups identified according to the recommendations of the ELN. However, this classification has limitations. To improve its predictability, new complementary biomarkers must be identified and characterized. During this thesis, we first developed a robust and reliable methodology to measure the oxygen consumption of leukemic cells of AML patients in order to assess the different states of mitochondrial oxidative phosphorylation as a potential functional biomarker of LAM. We then applied this methodology to measure the various metabolic parameters of blasts obtained from the blood of 58 patients with AML isolated at the time of diagnosis.

We first developed a protocol to measure, using the Seahorse XFe24, the different states of mitochondrial oxygen consumption of blasts isolated from the marrow or blood. We have shown that it was possible to measure the energy metabolism of these cells directly after collection, after 18 hours of post-collection cultures or after cultivation following their cryopreservation in liquid nitrogen. These protocols were developed in order to measure : the consumption of mitochondrial oxygen (whether or not coupled to ATP synthesis), as well as the spare respiratory capacity (SRC) which corresponds to the capacity of cells to accelerate the respiratory chain after exposure to the FCCP protonophore.

Then from a prospective cohort study (58 patients), we evaluated the different states of mitochondrial oxygen consumption of blasts obtained from the blood of patients with AML. Biostatistical analyzes, based on the calculation of the hazard-ratio, determined that SRC was significantly correlated with patient survival. After discretization of the SRC, we established a threshold distinguishing two groups of patients. Patients with blasts with SRC greater than 75 $\text{pmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 150\,000 \text{ cells}^{-1}$ exhibit significantly higher survival than patients with blasts with SRC below this threshold.

The SRC evaluated by oximetry is a value relating to the acceleration capacity of the respiratory chain of cells after exposure to the protonophore FCCP. We have therefore characterized the biochemical events associated with this acceleration from different AML cell lines or blasts from patients. Using pharmacological inhibitors (BPTES, UK5099 and Etomoxir), RNA interference approaches (MPC2 knock-down) and metabolomics analyzes (after incubation with $[\text{U}^{13}\text{C}]$ -Glucose or $[\text{U}^{13}\text{C}]$ -Glutamine), we demonstrated that the

oxidation of pyruvate via pyruvate dehydrogenase was a major pathway activated during the acceleration of respiratory chain activity induced by FCCP. Conversely, mitochondrial oxidation of glutamine is not necessary in this context.

In conclusion, we have shown that there is heterogeneity in the oxidative metabolism of blasts obtained from the blood of AML patients and that SRC can distinguish two groups of patients whose survival is significantly different. These results establish a solid methodological basis that can be used clinically and show the interest of SRC as a potential biomarker to complement the current biomarkers used to establish the ELN classification.

Abréviations

1

¹³C : carbone 13

2

2-DG : 2-désoxyglucose

A

ABC : Adénosine-triphosphate Binding Cassette

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ANT : Adénine nucléotide translocase

ASXL1 : Additional Sex Combs Like 1

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

B

BCOR : *BCL6 Co-repressor*

BCORL1 : *BCL6 Co-repressor Like 1*

BN-PAGE : Migration en bleu d'électrophorèse en gel de polyacrylamide natif

BRAF : Homologue B1 de l'oncogène viral du sarcome murin v-raf

C

CACT : Carnitine acyl-carnitine translocase

CAR-T cells : chimeric antigen receptor modified T-cells

CBL : *Casitas B-cell lymphoma*

CCCP : Carbonylcyanure m-chlorophénylhydrazone

CEBPA : CCAAT/enhancer binding protein alpha

CPT-I : Carnitine palmitoyltransferase I

CPT-II : Carnitine palmitoyltransferase II

CSF3R : Colony-stimulating factor 3

CSH : Cellule souche hématopoïétique

CSL : Cellule souche leucémique

D

DCA : Dichloroacétate

DNP : 2,4-dinitrophénol

DNMT3A : DNA méthyltransférase 3 alpha

E

ECOG : *Eastern Cooperative Oncology Group*

EIM : Espace intermembranaire mitochondrial

ELN : *European LeukemiaNet*

ETV6 : *E26 transformation-specific variant 6 gene*

EVI-1 : *Ecotropic virus integration site-1*

EZH2 : Histone lysine N-méthyltransférase

F

FAB : *French-American-British*

FAO : Oxydation des acides-gras

FCCP : Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone

FLT3 : *Fms-related tyrosine kinase 3*

G

G6PD : Glucose 6-phosphate déshydrogénase

G-CSFG : Facteur de stimulation des colonies de granulocytes

GATA1/2 : *GATA binding protein 1/2*

Glc : Glucose

Gln : Glutamine

GST : *Glutathione S-transferase*

H

H⁺ : Proton

HDAC : Histone désacétylase

HIF1 α : Facteur 1 alpha inductible par l'hypoxie

HR : Hazard Ratio

I

IDH1/2 : Isocitrate déshydrogénase 1/2

J

JAK2 : Janus kinase 2

K

KIT : Tyrosine-protein kinase Kit ou CD117

L

LAM : Leucémie aigüe myéloïde

LAM-CN : Leucémie aigüe myéloïde à caryotype normal

LAP : Leucémie promyélocytaire

LDH : Lactate déshydrogénase

LRP : Lung resistance protein

M

MDC : Cellules dendritiques

MEM : Membrane mitochondriale externe

MGG : May-Grünwald-Giemsa

MIM : Membrane mitochondriale interne

Mono : Monocytes
 MPC : Mitochondrial pyruvate carrier
 MPO : Myéloperoxydase
 MPO : Myéloperoxydase
 Mt Matrix : Matrice mitochondriale
 MRP1 : *Multidrug resistance-related protein*
N
 NADP : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
 NFS : Numération Formule Sanguine
 NIPBL : *Nipped-B-like protein*
 NLN : Neurolysine
 Non-CSL : Cellules leucémique non-souche
 NPM1 : *Nucleophosmin 1*
O
 OMS : Organisation Mondiale de la Santé
 OXPHOS : Phosphorylation oxydative
P
 PC : Pyruvate carboxylase
 PDH : Pyruvate déshydrogénase
 PDK : Pyruvate déshydrogénase kinase
 PDP : Pyruvate déshydrogénase phosphatase
 PHF6 : Plant Homeodomaine Finger Protein 6
 PPAR- δ : Récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes
 PTEN : *Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*
 PTPN11 : *Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11*
R
 RAD21 : *Cohesin Complex Component*
 RIT1 : *RAS-like GTP-binding*
 ROS : Espèces réactives de l'oxygène

RUNX1 : *RUNX Family Transcription Factor 1*
S
 SEM : Somme des écarts à la moyenne
 SETBP1 : *SET Binding Protein 1*
 SF3B1 : *Splicing Factor 3b Subunit 1*
 SLC25A3 : Protéine transporteuse de phosphate inorganique
 SMC1A : *Structural Maintenance of Chromosomes 1A*
 SMC3 : *Structural Maintenance of Chromosomes 3*
 SRC : *Spare reserve capacity* / Capacité de réserve respiratoire
 SRSF2 : *Serine And Arginine Rich Splicing Factor 2*
 STAG2 : *Stromal Antigen 2*
T
 TET2 : *Ten-Eleven translocation 2*
 TP53 : *Tumor protein 53*
U
 [U13C]-Glucose : Glucose dont les six atomes six de carbones ont une masse atomique de 13 u.m.a
 [U13C]-Glutamine : Glutamine dont les six atomes six de carbones ont une masse atomique de 13 u.m.a
 U2AF1 : *U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1*
 UCP : Protéines découplantes
 u.m.a : Unité de masse atomique
W
 WT1 : *Wilms' tumor*
Z
 ZRSR2 : *RNA Binding Motif And Serine/Arginine Rich 2*

Remerciements

Je remercie l'**Université de Lille** et la **Région Hauts-de-France** pour le financement de ce travail de thèse.

Je remercie le **Docteur Isabelle Van Seuningen** de m'avoir accueilli au sein de l'unité de recherche CANTHER. Ce fut un privilège de travailler dans votre unité.

Je remercie le **Professeur Philippe Delannoy** de m'avoir accueilli au sein de l'Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille.

Je remercie le **Professeur Bruno Quesnel** de m'avoir accueilli au sein de l'équipe Facteurs de persistance des cellules leucémiques et de m'avoir ouvert les portes des RCP. Ce fut une expérience particulièrement enrichissante de pouvoir prendre part à ces réflexions cliniques qui m'ont permises d'en apprendre plus sur le versant médical de la LAM.

Je remercie le **Docteur Catherine Brenner** et le **Docteur Nicolas Chapuis** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je remercie le **Docteur Anne Devin** d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie le **Docteur Jean-Emmanuel Sarry** pour l'intérêt porté à ce travail lors de nos nombreux échanges. C'est un honneur de vous voir participer à mon jury de thèse. Je tiens également à remercier votre équipe et tout particulièrement **Claudie Bosc** pour le travail effectué ensemble, ce fut un plaisir de collaborer avec vous.

Je remercie le **Professeur Philippe Marchetti**, pour sa bienveillance et toute la confiance qu'il a mis en moi lors de notre rencontre. Cela fait désormais 6 ans que j'ai l'opportunité de travailler à vos côtés et je dois dire que j'ai pu énormément apprendre et m'épanouir. Je vous suis véritablement reconnaissant d'avoir cru en moi et de m'avoir accompagné dans ce parcours.

Je remercie le **Docteur Jérôme Kluza**, pour son investissement dans tous les projets que nous avons mené ensemble depuis 5 ans ! Merci pour tout ce que vous m'avez appris, bien plus qu'un chef de laboratoire, vous avez été un véritable mentor ! Nos échanges m'ont toujours beaucoup apporté et j'ai pu apprendre à vos côtés le métier de chercheur. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir encouragé à mener cette thèse. Merci également pour votre enthousiasme indéfectible envers les résultats que nous avons obtenu.

A ma famille,

Vous qui avez toujours été là et qui m'avez soutenu dans ce long parcours.

Merci **Maman** de m'avoir soutenu peu importe les circonstances, d'avoir été là pour m'écouter pendant des heures parler de mon projet et d'avoir fait de moi la personne que je suis aujourd'hui. Merci également pour ta précieuse correction de cette thèse ! Je te suis infiniment reconnaissant pour tout ce que tu m'as donné et ce que tu continues de m'apporter.

Merci **Jean-Marie** pour ton soutien, tes encouragements et ta disponibilité à toute épreuve (on se souviendra des réparations en catastrophe de la 207 dans le froid à 8h du matin !). Ton investissement dans le travail et ta générosité m'ont grandement inspiré et m'ont servi d'exemple pendant ma thèse. C'est aussi grâce à toi que j'ai pu en être là aujourd'hui.

Merci **Arthur** pour ton soutien et tout ce que nous avons partagé ensemble !

Merci **Papa** pour tout ce que tu m'as transmis et ce que j'ai pu apprendre à tes côtés.

Merci à mon grand-père **Pierre**, la force tranquille, tu es une inspiration dans ma vie de tous les jours. Merci pour toutes les valeurs que tu m'as enseignées.

Merci à mes grands-parents **Suzanne, Marie-Louise** et **Georges** d'avoir toujours été là pour moi et pour tout le soutien que vous m'avez apporté.

Merci à **Justine** de m'avoir accompagné dans toutes ces épreuves et d'avoir été là pour moi au cours de toutes ces années qui n'étaient pas de tout repos ! Merci également pour ta relecture attentive.

A mes collègues,

De près ou de loin vous avez tous participé à rendre cette thèse exceptionnelle, et pour ça je tiens à tous vous remercier.

Dr. Anne Trinh, que de chemin parcouru depuis notre rencontre ! A l'époque tu étais en première année de thèse et me voilà sur tes traces ! Merci pour tout ce que tu m'as appris, merci pour toute la bonne humeur que tu amenais au laboratoire avec toi. Tu as été mon exemple, j'espère que tu seras fière du travail que je présente ici.

Dr. Nicolas Germain, merci énormément pour ton soutien et toutes nos discussions qui m'ont toujours permis d'avancer. Merci pour toute la bonne humeur que tu véhicules au sein du laboratoire. Enfin merci pour la machine à café, elle fut d'une aide incommensurable !

Dr. Laure Goursaud, merci de m'avoir intégré dans le service d'hématologie, je ne me suis jamais senti comme un étranger et ça a beaucoup compté pour moi. Merci pour ton investissement et tout le temps que tu as passé à recueillir les informations cliniques.

Dr. Céline Berthon, merci pour ta gentillesse et de m'avoir également intégré dans le service d'hématologie. Tu as toujours pris le temps de m'expliquer quand j'avais des questions et pour ça je te remercie.

Merci aux chercheurs de mon équipe, le **Dr. Marie-Hélène David-Cordonnier**, le **Dr. Meyling Cheok**, le **Dr. Suman Mitra**, le **Dr. Xavier Thuru**, le **Dr. Yasmine Touil**, le **Dr. Carine Brinster**, le **Dr. Salomon Manier** et le **Dr. Thierry Idziorek** pour leurs précieux conseils et leurs soutiens apportés tout au long de cette thèse.

Merci également au **Pr. Claude Preudhomme**, au **Dr. Alice Marceau** et au **Dr. Nicolas Duployez** pour leur participation à ce projet.

Dr. Samuel Meignan, merci pour ta bienveillance et de m'avoir ouvert les portes de ton laboratoire pour mes expériences en condition d'hypoxie ! Ce fut un plaisir de collaborer avec toi et ton équipe.

Salim Dekiouk, merci pour tout ce que tu m'as appris, merci pour la bonne humeur que tu apportes au laboratoire, merci d'avoir su trouver les mots aux moments où j'en avais besoin. Ce fut un plaisir de passer toutes ces années avec toi au laboratoire ! J'espère pouvoir t'exprimer toute ma gratitude un jour !

William Laine, merci à toi le rayon de soleil de l'IRCL. Merci pour ton soutien, pour toutes les heures passées ensemble au laboratoire que ce soit en manip ou à discuter. Merci de m'avoir soutenu durant toutes ces années. Et enfin, merci pour les délicieux grains de café (comment les oublier !). Tu avais raison, en liberté il n'y pas de gardien !

Dr. Mélanie Dhayer, merci pour toutes nos conversations et ton soutien ! Ce fut fortement agréable de partager avec toi la passion des petites crevettes !

Nathalie Jouy et **Emilie Floquet** merci pour vos conseils et votre aide. Merci également pour nos discussions qui ont le don de remonter le moral !

Marie Winter, merci pour notre collaboration, ce fut un plaisir de partager un petit bout de thèse avec toi !

Thomas Rico, merci pour la dose de bonne humeur que tu distribuais quand tu passais faire tes expériences de cytométrie !

Julie Vrevin, merci pour tout ton soutien et tout le temps passé à relire ma thèse. Courage pour la suite qui t'attend, tu peux accomplir de grandes choses !

Corentin Desousa, merci pour ta bienveillance et ta disponibilité.

Jean-Claude Vienne et **Catherine Cimetta**, merci pour votre aide avec l'Oroboros et les bons moments passés à vos côtés ! Vous êtes en or !

Dr. Marie Boileau, Stéphanie Brun, Amélia Jordao, Samra Holuigue, Aurélie Guillemette, Adeline Cozzanie, Jean-Baptiste Weyenbergh, Romain Magnez merci pour votre bonne humeur, vos encouragements et pour toutes nos conversations qui m'ont toujours remonté le moral.

Hassiba Bouafia et **Pauline Peyrouze**, merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis d'être responsable de L2, cela fut une belle occasion pour moi de m'investir au sein du laboratoire ! Merci également pour vos conseils avisés quand j'en ai eu besoin !

Patrick Devos merci pour votre bienveillance dans l'explication de cette sombre discipline qu'est la biostatistique ! Ce fut un plaisir de travailler avec vous.

Merci au personnel de l'IRCL, **Micheline**, **Corinne** et **Mathias**.

Michel merci de veiller sur nous ! C'était toujours agréable de te voir venir faire un petit coucou quand je restais tard au labo.

A mes stagiaires, A mes piou-pious,

C'est aussi grâce à vous que ce travail a été réalisé et je tenais donc à vous remercier

Merci **Marianne Gauthier** pour ta motivation remarquable !

Merci **Valentin Hardelin** pour ton investissement et les riches moments passés ensemble en culture !

Merci **Sacha Masquelier** pour l'intérêt que tu as porté à nos recherches !

Merci **Corentin Rembry** pour ta pugnacité !

Merci **Hadrien Claus** pour ta détermination à accomplir les expériences en condition tropicale !

Merci **Karen Rojas Toledo** pour ta ténacité !

Merci **Maxime Lebellou** pour ta productivité !

Merci **Quiterie Boyer-Vidal** pour ton efficacité !

Aux nouveaux arrivants,

Axel Chomy, une grande aventure t'attend ! Si un jour tu en as besoin, tu pourras compter sur tout mon soutien !

Claire Degand, à toi qui prends la suite de ce projet, je te souhaite le meilleur ! Que ce soit pour célébrer tes victoires ou te remonter le moral tu pourras compter sur moi !

Productions scientifiques

Articles et revues

1 – Anne Trinh*, Raeeeka Khamari*, **Quentin Fovez***, François-Xavier Mahon, Béatrice Turcq, Didier Bouscary, Patrice Maboudou, Marie Joncquel, Valérie Coiteux, Nicolas Germain, William Laine, Salim Dekiok, Bart Ghesquiere, Thierry Idziorek, Bruno Quesnel, Jerome Kluza[#], Philippe Marchetti[#]. (# co-seniorship author). Antimetabolic cooperativity with the clinically approved kidrolase and tyrosine kinase inhibitors to eradicate cml stem cells.. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.09.21.305714> (**En revision favorable dans Molecular Metabolism**) (* first co-author)

2 - **Quentin Fovez**, William Laine, Laure Goursaud, Celine Berthon, Nicolas Germain, Claire Degand, Jean-Emmanuel Sarry, Bruno Quesnel, Philippe Marchetti and Jerome Kluza. Clinically relevant oxygraphic assay to assess mitochondrial energy metabolism from acute myeloid leukemia patients (**Cancers, soumis**)

3 – Claudie Bosc, Estelle Saland, Aurélie Bousard, Noémie Gadaud, Marie Sabatier, Guillaume Cognet, Thomas Farge, Emeline Boet, Mathilde Gotanègre, Nesrine Aroua, Pierre-Luc Mouchel, Clément Larrue, Eléonore Kaphan, Ambrine Sahal, Latifa Jarrou, Marie Tolosini, Florian Rambow, Nathaniel Polley, Florence Cabon, Nathalie Nicot, Laura Poillet-Perez, Xiaoyang Su, **Quentin Fovez**, Jérôme Kluza, Rafael José Argüello, Céline Mazzotti, Hervé Avet-Loiseau, François Vergez, Jérôme Tamburini, Jean-Jacques Fournié, Andrew Wei, Tony Kaoma, Jean-Christophe Marine, Christian Récher, Lucille Stuani, Carine Joffre and Jean-Emmanuel Sarry. Mitochondrial determinants of response and resistance to venetoclax plus cytarabine duplet therapy in acute myeloid leukemia. **2021, Nature Cancer (in press)**

4 – Jérôme Kluza, Victoriane Peugnet, William Laine, Gwenola Kervoaze, Gaëlle Rémy, Anne Loyens, Patrice Maboudou, **Quentin Fovez**, Corinne Grangette, Isabelle Wolowczuk, Philippe Gosset, Guillaume Garçon, Philippe Marchetti, Florence Pinet, Muriel Pichavant, Emilie Dubois-Deruy. A new strategy to preserve and assess oxygen consumption in murine tissues (En révision dans PlosOne)

5 – Nicolas Germain, Mélanie Dhayer, Marie Boileau, **Quentin Fovez**, Jerome Kluza and Philippe Marchetti. Lipid Metabolism and Resistance to Anticancer Treatment. **Biology** 2020, 9(12), 474; <https://doi.org/10.3390/biology9120474>

6 - Marchetti P, **Fovez Q**, Germain N, Khamari R, Kluza J. Mitochondrial spare respiratory capacity: Mechanisms, regulation, and significance in non-transformed and cancer cells. doi: 10.1096/fj.202000767R. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 32808332. **FASEB J.** 2020 Aug 17.

Présentations internationales

1 – 4th International Cancer Symposium / Cancer Research Center of Lyon (Octobre 2019)
Metabolic regulation of mitochondrial spare respiratory capacity : a potential biomarker of AML persistence (poster)

2 – 11th World Conference on Targeting Mitochondria 2020 (Octobre 2020)
Mitochondrial Spare Respiratory Capacity : A New Predictive Metabolic Biomarker for Aggressiveness of Acute Myeloid Leukemia ? (poster presentation)

3 – 62nd ASH Annual Meeting and Exposition (Décembre 2020)
Mitochondrial Spare Respiratory Capacity : A New Predictive Metabolic Biomarker for Aggressiveness of Acute Myeloid Leukemia ? (short oral presentation)

4 - 62nd ASH Annual Meeting and Exposition (Décembre 2020)
Antimetabolic Cooperativity with l-Asparaginase and Tyrosine Kinase Inhibitor Quizartinib to Eradicate Persistent FLT3-ITD Leukemic Cells (short oral presentation)

Introduction

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) constituent un ensemble d'hémopathies malignes caractérisées par l'expansion clonale dans la moelle osseuse de précurseurs de cellules sanguines bloqués à un stade précoce de leur différenciation, les blastes leucémiques. Avec environ 3 000 nouveaux cas par an en France, les LAM font partie des cancers rares. Bien qu'il existe des formes pédiatriques, les LAM se déclarent majoritairement chez le sujet âgé avec un âge médian au diagnostic de 68 ans. Le diagnostic et le suivi de la maladie reposent sur différents examens biologiques et biochimiques des blastes du sang et de la moelle osseuse. De façon générale, Les LAM sont des hémopathies particulièrement agressives dont la survie à 5 ans reste de 24% (1). Cette faible survie s'explique entre-autre par le fait que même si deux tiers des patients répondent initialement au traitement, la majorité de ces patients finiront par rechuter. Ces rechutes sont notamment dues à la présence ou à l'acquisition d'anomalies moléculaires dans certaines cellules leucémiques (2). A l'heure actuelle, l'un des enjeux majeurs dans les LAM réside dans leur prise en charge thérapeutique qui se base sur l'identification de biomarqueurs (3). Mais la mise en place d'une meilleure prise en charge permettrait de prévenir la rechute. Il est donc indispensable d'étoffer le panel de biomarqueurs disponibles pour parvenir à éradiquer les cellules leucémiques avant même qu'elles ne soient responsables de la rechute. En effet, il existe une grande diversité de candidats médicaments ou d'associations thérapeutiques qui ne peuvent pas tous être testés au travers d'essais cliniques (4). Il est donc nécessaire de déterminer sur une base préclinique quelles molécules ou combinaisons de molécules seraient les plus efficaces selon le profil du patient (5,6). Pour répondre à cette problématique il est donc primordial de développer de nouveaux biomarqueurs permettant d'orienter la stratégie thérapeutique.

1. Les Leucémies Aigues Myéloïdes

1.1 Etiologie

Une LAM peut apparaître *de novo* sous l'effet de facteurs favorisant la survenue de ce type de cancer comme l'âge, l'obésité, l'existence d'anomalies chromosomiques constitutionnelles (trisomie 21, maladie de Fanconi), un déficit de TP53 (Tumor protein 53) (syndrome de Li-Fraumeni), des déficits immunitaires constitutionnels (ataxie-télangiectasie) ou encore l'exposition à des agents mutagènes tels que les hydrocarbures benzéniques (7-9).

Une LAM peut également se développer à la suite de traitements anticancéreux. Le développement d'une LAM secondaire est dû à l'utilisation de radiations ionisantes ou de chimiothérapies anticancéreuses ayant recours aux agents alkylants (comme la cyclophosphamide) ou aux inhibiteurs de topoisomérase II (comme les anthracyclines et les épipodophyllotoxines) (10,11).

Mais une LAM peut aussi se développer à cause de l'acutisation d'une hémopathie sous-jacente. Parmi les hémopathies favorisant l'apparition d'une LAM secondaire, différentes pathologiques sont impliquées. C'est le cas des syndromes pré-leucémiques regroupant les syndromes myéloprolifératifs avec notamment la maladie de Vaquez (*polycythemia vera*), les syndromes myélodysplasiques ainsi que les myélofibroses primaires. Ces hémopathies induisent à long terme une fibrose médullaire et installent un environnement pro-inflammatoire qui pourra favoriser la transformation en LAM. Les risques d'évolution au bout de 10 ans sont variables et vont de 2,3% pour la maladie de Vaquez à 10-20% pour les myélofibroses primaires (12,13).

1.2 Signes cliniques

Les LAM sont caractérisées par une prolifération des blastes (syndrome tumoral) et s'accompagnent d'insuffisance médullaire (14). La prolifération anarchique des cellules leucémiques provoque une hypertrophie des organes hématopoïétiques (adénopathie ou splénomégalie). Les blastes peuvent également être retrouvés en dehors du compartiment hématopoïétique dans le cadre d'un envahissement du compartiment méningé donnant lieu à des céphalées et à des paralysies. Ils peuvent également se localiser au niveau cutané, buccal ou osseux provoquant ainsi des douleurs. Dans certains cas, une hyperleucocytose est retrouvée. Elle se caractérise par une quantité de leucocytes supérieure à $100 \times 10^9/L$ et peut s'accompagner de leucostase qui correspond à l'accumulation anormale de globules blancs dans les capillaires pulmonaires et cérébraux provoquant une hypoxie réfractaire, une détresse respiratoire et des troubles de conscience allant jusqu'au coma. L'insuffisance médullaire quant à elle est responsable d'anémie, de neutropénie à risque infectieux et de syndrome hémorragique cutané ou muqueux en rapport avec la thrombopénie.

1.3 Hiérarchie hématopoïétique des LAM

Au sein de la moelle osseuse des individus sains se trouvent les précurseurs de toutes les cellules sanguines : les cellules souches hématopoïétiques (CSH). Les CSH résident au sein d'une structure anatomique et fonctionnelle : la niche hématopoïétique. C'est dans cette niche que les CSH assurent, grâce à une division cellulaire asymétrique, d'une part le

renouvellement du stock de CSH et d'autre part la production de tous les éléments figurés du sang. La première étape de l'hématopoïèse se caractérise par une différenciation de la CSH en progéniteur lymphoïde commun ou en progéniteur myéloïde commun (Figure 1).

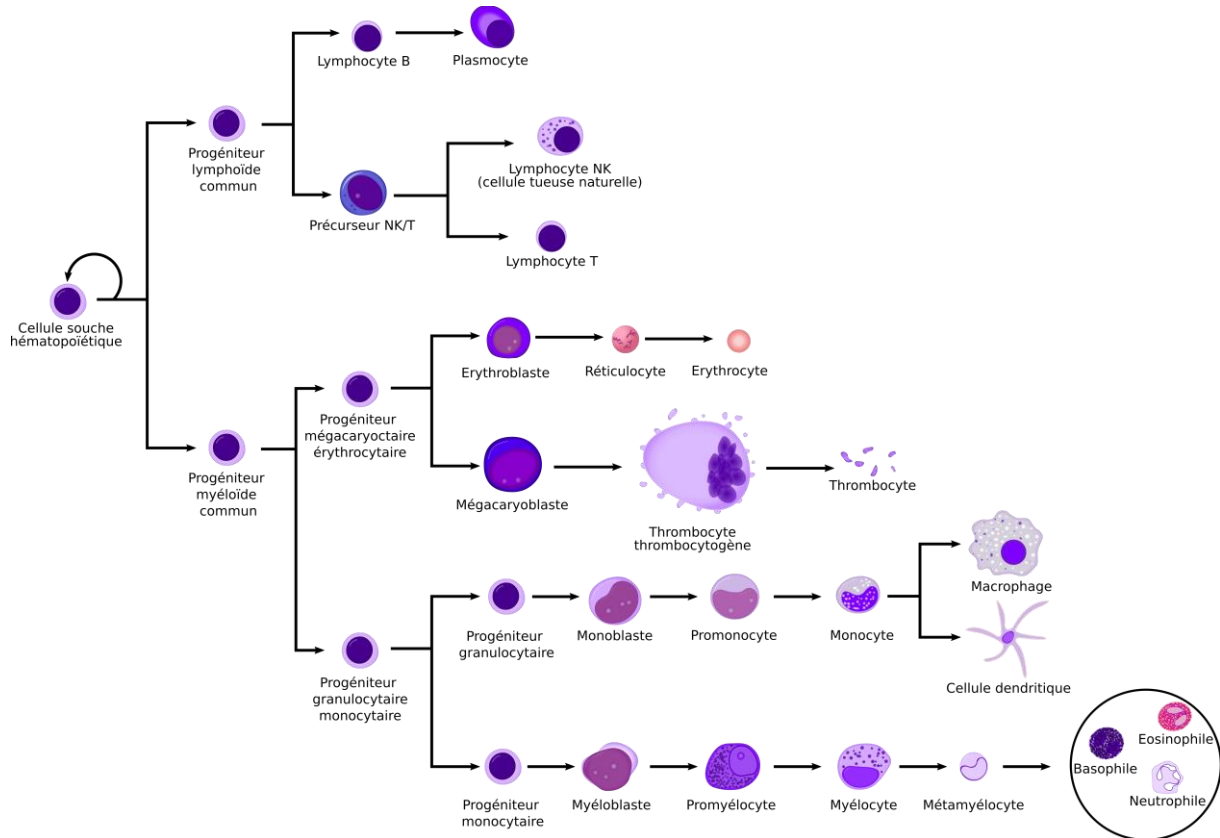


Figure 1. Schéma général de l'hématopoïèse du sujet adulte sain. Adapté de Mikael Häggström, utilisé avec permission.

Chez les patients atteints de LAM, cette notion de cellules souches est également retrouvée avec d'une part les cellules souches leucémiques (CSL) et d'autre part les cellules leucémiques non-souches (non-CSL). Les CSL sont définies comme une population rare de cellules leucémiques primitives résidant dans la niche hématopoïétique et étant à l'origine de toutes les autres cellules leucémiques. Contrairement aux non-CSL qui sont fortement prolifératives, les CSL sont des cellules relativement quiescentes (15–17).

Les CSL ont une capacité d'auto-renouvellement aberrante et une prolifération indéfinie. Elles surproduisent les blasts leucémiques, qui sont extrêmement prolifératifs et qui ne parviennent pas à maturité complète. Ces blasts bloquent la fonction et le développement des cellules sanguines matures. Par conséquent, l'un des objectifs initiaux du traitement est l'élimination rapide des cellules blastiques afin de favoriser la récupération hématopoïétique (18).

Au-delà de cette dichotomie entre CSL et non-CSL, les travaux de van Galen *et al.* (Cell, 2019) ont révélé à l'aide d'analyses par séquençage de cellule-unique (ou « single-cell ») l'existence d'au moins 6 types cellulaires distincts dans les LAM : les cellules souches leucémiques (CSL), les cellules progénitrices leucémiques, les cellules progénitrices leucémiques de granulocytes-macrophages (GMP - granulocyte-macrophage progenitor), les promonocytes leucémiques, les monocytes leucémiques et les cellules dendritiques leucémiques (19).

1.4 Démarche diagnostique

La démarche diagnostique d'une LAM débute par une prise de sang périphérique ainsi que d'une ponction médullaire. Ces prélèvements fournissent le matériel biologique nécessaire à l'étude et à la caractérisation de la LAM. Le diagnostic biologique d'une LAM nécessite la réalisation d'une numération de la formule sanguine, d'une étude morphologique réalisée à partir d'un frottis médullaire, d'une étude cytochimique, d'un immunophénotypage, d'une étude cytogénétique et d'études biomoléculaires. Ces techniques sont présentées ci-dessous (20).

1.4.1 La Numération Formule Sanguine (NFS)

L'hémogramme d'une LAM se caractérise par : une anémie, une thrombopénie, une leucocytose très variable allant de moins de $3 \times 10^9/L$ à plus de $100 \times 10^9/L$ et une neutropénie (concentration de neutrophiles inférieure à $1,5 \times 10^9/L$) (21).

1.4.2 Le frottis médullaire

Le frottis médullaire permet l'analyse morphologique des cellules hématopoïétiques issues de la moelle osseuse. Le prélèvement médullaire est étalé sur une lame et est coloré avec le polychrome May-Grünwald-Giemsa (MGG). Cette coloration marque l'acide ribonucléique (ARN), le cytoplasme ainsi que les nucléoles en bleu ; l'acide désoxyribonucléique (ADN) et les granulations basophiles en rouge-violet ; et l'hémoglobine et les granulations éosinophiles en rouge-orangé (Figure 2). Grâce à cette coloration il est possible d'apprécier par microscopie optique la morphologie cellulaire, les différentes granulations azurophiles (corps d'Auer) et éosinophiles ainsi que les lobulations nucléaires. L'absence de détection de ces granulations est indicatrice d'une forme de LAM faiblement différenciée. Le diagnostic de LAM est porté en présence de 20% ou plus de blastes dans la moelle osseuse. 4 types de

blastés différents peuvent être trouvés : les myéloblastes, les monoblastes, les mégacaryoblastes et les promonocytes (22).

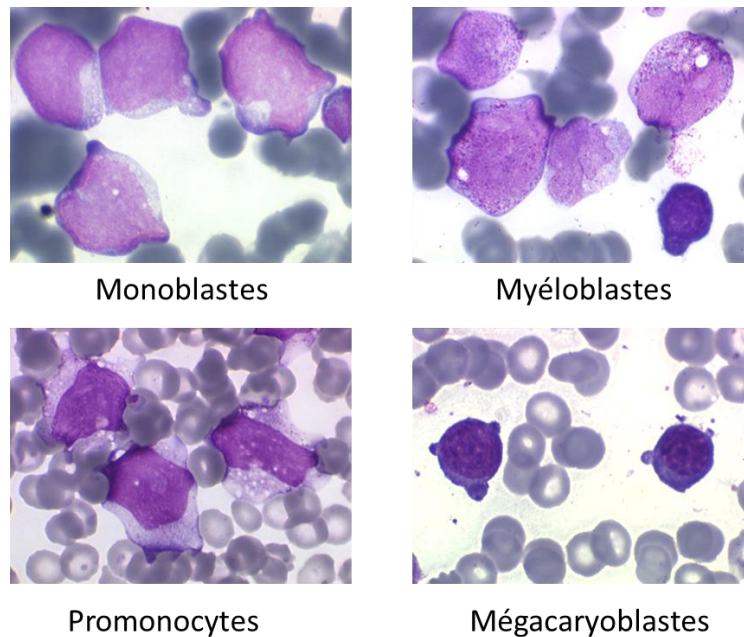


Figure 2. Coloration MGG de différents frottis médullaire représentant les différents types de blastés. (Haut - Grossissement x100 / Bas - Grossissement x40)

1.4.3 L'étude cytochimique

L'étude cytochimique recherche la présence d'une activité enzymatique myéloperoxydase (MPO), caractéristique de la lignée myéloïde, afin de poser le diagnostic différentiel entre une leucémie aigüe myéloïde ou lymphoïde. La MPO est physiologiquement présente au niveau des granulations primaires des cellules de la lignée granulomonocytaire et participe à la défense immunitaire contre les pathogènes par son activité de peroxydation. La MPO a également été décrite dans la littérature comme participant à la résistance aux molécules de chimiothérapies dans les LAM (23).

1.4.4 L'immunophénotypage

Réalisé par cytométrie en flux, l'immunophénotypage recherche l'expression de marqueurs cellulaires et cytoplasmiques de différenciation (Tableau 1). Cet examen permet également de confirmer l'appartenance à la lignée myéloïde et de déterminer l'état de différenciation des cellules leucémiques. Le repérage des cellules blastiques au sein d'un échantillon s'effectue selon un consensus visant à « fenêtrer » les cellules exprimant faiblement le marqueur pan leucocytaire CD45 (2). Grâce à des études utilisant à la fois l'immunophénotypage et le

séquençage, différentes associations de marqueurs phénotypiques correspondant aux CSL ont été identifiées : ($\text{Lin}^-/\text{CD34}^+/\text{CD38}^-/\text{CD99}^-/\text{TIM-3}^-$) qui distingue les CSL fonctionnellement normales des CSL de patients et ($\text{CD34}^+/\text{CD38}^-/\text{IL1RAP}^+/\text{CD123}^+/\text{CD45RA}^+$) qui correspond aux blastes issus de la moelle osseuse de patients atteints de LAM secondaire (24).

Marqueurs cellulaires et cytoplasmiques	
Diagnostique de LAM	
Précurseurs	CD34, CD117, CD33, CD13, HLA-DR
Granulocytes	CD65, MPO cytoplasmique
Monocytes	CD14, CD36, CD64
Mégacaryocytes	CD41, CD61
Erythroïdes	CD235a, CD36

Tableau 1. Principaux marqueurs cellulaires et cytoplasmiques utilisés dans le diagnostic des LAM. MPO : myéloperoxydase.

1.4.5 La cytogénétique (conventionnelle ou hybridation in situ)

La cytogénétique permet d'observer les anomalies caryotypiques de nombre ou de structure (insertion, délétion, translocation). Cette analyse participe à la classification des différents types de LAM puisque certaines anomalies caryotypiques constituent un facteur pronostique indépendant des autres facteurs de risque : favorable pour les LAM avec des translocations $t(8;21)$, $t(15;17)$ et inversion ou translocation du chromosome 16, $inv(16)/t(16;16)$ et défavorable avec délétion du bras long du chromosome 5 $del(5q)$, réarrangement de la région 11q23 et caryotypes complexes (25).

1.4.6 La biologie moléculaire

La biologie moléculaire repose sur des techniques de PCR et de séquençages de nouvelles générations. Elle permet la recherche de transcrits de fusion récurrents dans les LAM ou d'anomalies moléculaires. Elle participe à l'évaluation pronostique et permet un suivi de la maladie résiduelle après la mise en place du traitement. La biologie moléculaire constitue aujourd'hui un outil majeur dans la prise en charge et le suivi des LAM. Grâce aux connaissances acquises suite au développement de cette approche, de nombreuses anomalies moléculaires ont ainsi pu être associées à un impact pronostique (voir 1.7.3 Anomalies moléculaires).

1.4.7 La cryoconservation de blastes et de matériel cellulaire

La congélation d'échantillons biologiques (blastes primaires, ADN et ARN) permet la confirmation d'analyses initiales ou la recherche de nouvelles anomalies (en cas de rechute par exemple). L'utilisation des résultats obtenus au cours de la démarche diagnostique permet ensuite aux cliniciens de classer les LAM.

1.5 La classification FAB (French-American-British)

Établie en 1976 par un groupe coopérateur franco-américano-britannique, la classification FAB repose sur des critères cytologiques et cytochimiques et distingue 8 entités (de M0 à M7) selon le stade de différenciation dans lequel les cellules hématopoïétiques sont bloquées (26) (Figure 3).

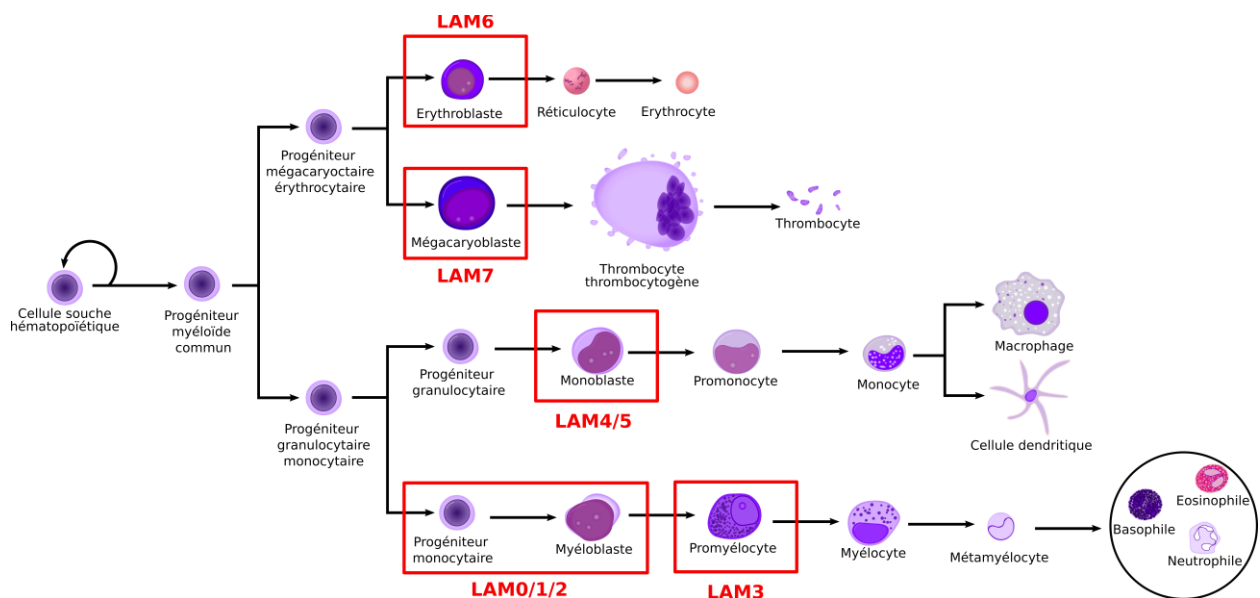


Figure 3. Schéma de l'hématopoïèse et des différents sous-types de LAM associés au blocage dans la différenciation hématopoïétique. LAM0 (indifférenciée) ; LAM1 (myéloblastique sans maturation) ; LAM2 (myéloblastique avec maturation) ; LAM3 (promyélocytaire) ; LAM4 (myélomonocytaire) ; LAM5 (monoblastique) ; LAM6 (érythrocytaire) ; LAM7 (mégacaryoblastique).

1.6 Classification OMS 2016

La classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) regroupe différents éléments cliniques, phénotypiques, cytogénétiques et moléculaires et définit 7 catégories de LAM (Tableau 2). Elle inclue des données qui n'étaient pas prises en compte dans la classification FAB, telles que les anomalies cytogénétiques, la notion de myélodysplasie pré-existante ou les antécédents de chimiothérapie (27).

<i>Types</i>	<i>Sous-types</i>
LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes (3/10 des LAM)	t(8:21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1;q22) ou (16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 LAP avec PML-RARA t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM (LAM Mégacaryocytaire) t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1 BCR-ABL1 NPM1 muté CEBPA avec mutation bi-allélique RUNX1 muté
LAM avec dysplasie multi-lignée (1/10 des LAM)	
LAM secondaire à une chimiothérapie (1/10 des LAM)	LAM avec différenciation minimale LAM sans maturation LAM avec maturation Leucémie myélomonocytaire aiguë Leucémie monoblastique / monocytaire aiguë Leucémie érythroïde aiguë Leucémie érythroïde pure Leucémie mégacaryocytaire aiguë Leucémie basophile aiguë Panmyélose aiguë avec myélofibrose
LAM inclassable dans les 3 premières catégories et classées selon la FAB (5/10 des LAM)	
Prolifération myéloïde associée au syndrome de Down	Prolifération myéloïde transitoire Leucémies myéloïdes associées au syndrome de Down
Sarcome Myéloïde	
Néoplasme à cellules dendritiques plasmacytoïdes blastiques	

Tableau 2. Classification de l'OMS

Grâce au développement des connaissances sur la leucémogénèse, différents biomarqueurs pronostiques et prédictifs ont pu être mis en évidence dans les LAM.

1.7 Biomarqueur pronostique et prédictif dans les LAM

Au sens le plus large un biomarqueur correspond à tout paramètre évalué de manière qualitative (par exemple gène muté ou non-muté) et/ou quantitative (par exemple l'âge d'un patient). Ce paramètre peut servir au dépistage d'une maladie, à l'établissement d'un diagnostic différentiel, à l'orientation de la stratégie thérapeutique et au pronostic d'évolution d'une pathologie (28). Le recours aux biomarqueurs, permettant d'établir des classifications, répond à deux enjeux majeurs : d'une part il permet au clinicien d'orienter sa stratégie thérapeutique de médecine personnalisée ; d'autre part il permet d'apporter des réponses aux patients quant à leur chance de survie. L'accès aisé aux cellules leucémiques constitue un atout majeur dans la recherche de biomarqueur dans les LAM. En effet la réalisation d'une prise de sang ou d'une ponction médullaire permet directement de travailler sur les blastes. Ainsi, à l'aide de différentes approches méthodologiques qui seront présentées par la suite, de nombreux biomarqueurs ont pu être identifiés.

1.7.1 Facteurs de risque liés au patient

Dans la LAM, les sujets âgés ont *de facto* un pronostic plus défavorable. La limite d'âge pour définir un patient comme âgé varie dans la littérature entre 60 et 65 ans (29–32). L'agressivité des LAM chez ces patients est notamment due à l'existence de comorbidités et d'une sensibilité accrue aux effets secondaires induits par la chimiothérapie. Par ailleurs le « statut de performance » d'un patient est également un facteur. En effet, il a été démontré que les patients avec un bon statut de performance ont un pronostic plus favorable (33,34). Chez les patients atteints d'un cancer, l'évaluation du statut de performance consiste à évaluer l'état de santé général et la capacité à réaliser différentes activités du quotidien. L'évaluation du « statut de performance » est réalisée à l'aide de l'échelle ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group). En plus d'avoir un intérêt pronostique, l'ECOG est également un facteur pris en compte pour l'inclusion dans un essai clinique ou dans la constitution d'un projet de greffe (35).

1.7.2 Anomalies cytogénétiques

Les anomalies cytogénétiques sont fréquentes dans les LAM puisque plus de la moitié des patients présentent un caryotype anormal. La plupart de ces anomalies affectent des gènes impliqués dans la régulation de l'hématopoïèse. L'étude de l'impact de ces anomalies cytogénétiques, sur la survie et le pronostic de larges cohortes de patients, a permis d'établir différents profils qui seront détaillés dans les paragraphes suivants (36).

1.7.2.1 Profils cytogénétiques favorables

Les profils cytogénétiques favorables regroupent les patients avec un caryotype normal (LAM-CN) et ceux présentant des anomalies particulières mais dont la prise en charge thérapeutique démontre de meilleurs résultats.

Core Binding factor (CBF) : différentes anomalies génétiques peuvent affecter le complexe de facteur de transcription CBF. Sont ainsi décrites, la translocation t(8;21) responsable de la formation du gène de fusion RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO) et l'inversion inv(16)/translocation t(16;16) à l'origine du gène de fusion CBFβ-MYH11. Ces réarrangements cytogénétiques perturbent les gènes qui codent des sous-unités de CBF, menant à une dérégulation de l'hématopoïèse de nature épigénétique à travers l'action des histones désacétylases et des ADN méthyltransférases qui engendrent une répression des

gènes impliqués dans la différenciation hématopoïétique. Ce sous-groupe cytogénétique de LAM est de bon pronostic (37).

Pro-Myelocytic Leukemia/Retinoic Acid Receptor Alpha (PML-RARA) : la mutation PML-RARA est caractéristique de la leucémie aigue promyélocytaire (LAP), représentant 10 à 15% des cas de LAM, elle correspond à une translocation t(15;17) donnant le gène de fusion PML-RARA. En dehors de la fusion entre PML et RARA retrouvée dans 98% des LAP, huit autres gènes fusionnant avec RARA ont été identifiés (ZBTB16, NPM1, NUMA1, STAT5B, BCOR, PRKAR1A, FIP1LA, NABP1). Ces protéines chimériques répriment la signalisation de l'acide rétinoïque en recrutant des corépresseurs de transcription contenant des histones désacétylases (HDAC) et des histones méthyltransférases ce qui induit un blocage de la différenciation au stade promyélocytaire (38). Les LAP sont des LAM avec un pronostic très favorable avec 77% des patients en vie après 10 ans de suivi (39).

1.7.2.2 Profils cytogénétiques défavorables

Les profils cytogénétiques défavorables regroupent l'ensemble des anomalies cytogénétiques retrouvées dans les LAM à l'exception de la t(8;21). La présence de ces anomalies est de pronostic intermédiaire voire défavorable.

Mixed Lineage Leukemia (MLL) : le gène MLL est situé sur le chromosome 11q23. MLL peut subir différents réarrangements : translocation et production de gène de fusion, duplication en tandem partielle et amplification. Toutes ces anomalies induisent des formes agressives de LAM de mauvais pronostic. MLL est une histone méthyltransférase impliquée dans la régulation épigénétique de l'hématopoïèse. Les différentes mutations de MLL engendrent un blocage de la différenciation cellulaire et soutiennent l'expression des gènes *HOX* participant ainsi à l'immortalisation des cellules leucémiques (40).

DEK-NUP214 : la translocation t(6;9) est une aberration cytogénétique rare dans les LAM survenant dans 0,7 à 1,8% des cas. Cette translocation mène à la formation d'un gène de fusion chimérique, DEK-NUP214 (anciennement DEK-CAN). La protéine de fusion DEK-NUP214 soutient la prolifération cellulaire en activant différentes voies de signalisation dont mTORC1 (mechanistic target of rapamycin complex 1). La présence de cette translocation est associée à un mauvais pronostic ainsi qu'à des chances de rémission après chimiothérapie inférieures à 50% (41).

1.7.3 Anomalies moléculaires

Les connaissances actuelles sur les LAM mettent en évidence le rôle clé des anomalies moléculaires dans la leucémogénèse. Il est ainsi décrit qu'une LAM se développe à partir d'une CSH accumulant des mutations somatiques au fil du temps. Ces dernières conduisent à un blocage de la différenciation et confèrent des propriétés d'auto-renouvellement sans restriction, permettant ainsi aux CSH mutées de se développer de manière clonale. Cette évolution clonale repose sur la survenue d'événements pré-leucémiques impliquant des mutations des gènes impliqués dans la régulation épigénétique. L'apparition de ces mutations fournit un avantage prolifératif qui reste toutefois insuffisant pour induire seul une LAM. Il faudra l'apparition d'anomalies moléculaires supplémentaires affectant d'autres gènes tels que ceux impliqués dans les voies de signalisation ou encore le gène de la nucléophosmine (NPM1) pour initier la LAM et ainsi mener à l'événement clinique induisant son diagnostic (42–44).

Si la survenue de mutations est essentielle dans la leucémogénèse, les événements mutationnels sont également retrouvés tout au long de l'évolution de la maladie. Ainsi, il existe des changements dynamiques dans le paysage mutationnel de la LAM qui sont le résultat de l'évolution clonale, où les clones hébergeant de nouvelles mutations sont constamment soumis à une pression sélective dans le microenvironnement de la moelle osseuse. Cette évolution clonale se poursuit lors de la phase de traitement qui participe à la pression de sélection clonale. Par conséquent, lors des rechutes, la configuration génomique des LAM varie souvent par rapport à leurs formes originelles. Ces mécanismes d'évolution clonale sont abordés au sein de la revue publiée par Martignoles *et al.*, (IJMS, 2018) (45).

De nombreuses études ont été menées sur l'impact pronostique que pouvaient avoir les différentes mutations retrouvées dans les LAM et il en découle une dichotomie entre les anomalies moléculaires ayant un impact clairement identifié sur la survie des patients et celles dont le rôle sur le pronostic reste indéterminé.

1.7.3.1 Les mutations impactant le pronostic

Les mutations impactant le pronostic se répartissent au sein de différentes catégories fonctionnelles. La première catégorie rassemble les mutations entraînant un dérèglement des protéines intervenant dans la régulation épigénétique au niveau de la méthylation de l'ADN. La seconde catégorie correspond aux mutations affectant des récepteurs tyrosine kinase ou les mutations de protéines de voie de signalisation qui confèrent un avantage prolifératif et/ou de

survie aux cellules leucémiques. La troisième catégorie rassemble les mutations affectant les gènes impliqués dans la modification de la structure de la chromatine en agissant sur les histones. La quatrième concerne les gènes impliqués dans l'expression ou l'activité des facteurs de transcription qui entraînent un blocage de la différenciation myéloïde. La cinquième concerne les gènes impliqués dans le complexe de la cohésine. La sixième réunit les gènes suppresseurs de tumeur. La septième est dédiée à la protéine chaperonne nucléophosmine 1 (NPM1). La dernière concerne l'oncogène Ecotropic Viral Integration Site 1 (EVI-1) (46).

1.7.3.1.1 Méthylation

DNA méthyltransférase 3 alpha (DNMT3A) est une méthyltransférase qui catalyse l'addition d'un groupe méthyle au résidu cytosine du dinucléotide CpG. Elle joue donc un rôle essentiel dans la méthylation de l'ADN et la régulation de l'expression génique. Elle est particulièrement impliquée dans le renouvellement des cellules souches hématopoïétiques et dans la différenciation myéloïde. Les mutations de DNMT3A entraînent une perte de fonction perturbant la régulation épigénétique de l'expression de gènes impliqués dans la différenciation. Ces mutations sont associées à un pronostic clinique défavorable (47).

Isocitrate déshydrogénase (IDH 1/2) : les gènes IDH1 et IDH2 codent pour des isocitrate déshydrogénases dépendantes du NADP qui sont respectivement localisées dans le cytosol et la mitochondrie. Ces enzymes catalysent la décarboxylation de l'isocitrate en alpha-cétoglutarate dans le cycle de l'acide citrique ; cet alpha-cétoglutarate pourra être utilisé par la protéine TET (Ten-Eleven translocation) pour la déméthylation des histones. Toutes les mutations d'IDH1 et 2 sont hétérozygotes et affectent une arginine présente au niveau du site catalytique de l'enzyme : l'arginine 132 pour IDH1 et l'arginine 140 ou 172 pour IDH2. Les enzymes mutées acquièrent une fonction néomorphique, les rendant capables de convertir l'alpha-cétoglutarate en 2-hydroxyglutarate (2-HG), qui est un oncométabolite inhibant l'activité de TET2. L'inhibition de TET2 induit une hyperméthylation de l'ADN et bloque la déméthylation des histones en inhibant les histones déméthylases. Les mutations IDH1/2 et TET2 s'excluent mutuellement. Le blocage du processus de déméthylation inhibe la différenciation des cellules souches hématopoïétiques et supporte l'expansion clonale. Habituellement, la mutation d'IDH est associée à un pronostic défavorable mais selon son association avec des mutations de FLT3 et NPM1 son impact est variable (48).

Ten-Eleven translocation 2 (TET2) est une méthylcytosine dioxygénase dépendante de l'alpha-cétoglutarate impliquée dans la régulation épigénétique de la différenciation hématopoïétique. TET2 catalyse la conversion de la 5-méthylcytosine en 5-hydroxyméthylcytosine. Les mutations de TET2 contribuent à la leucémogénèse en modifiant la régulation épigénétique de la transcription *via* la méthylation de l'ADN. L'incidence des mutations TET2 est d'environ 10 à 20% dans la LAM. La mutation de TET2 est associée à un mauvais pronostic (49).

1.7.3.1.2 Voies de signalisation

Colony-stimulating factor 3 (CSF3R) est un récepteur au G-CSF contribuant à la différenciation granulocytaire ainsi qu'à la prolifération et à la survie de ces cellules. Les mutations CSF3R sont rares dans la LAM et n'ont pas été évaluées seules en tant que marqueur pronostique. Toutefois chez les patients porteurs d'une double mutation CEBPA (CEBPAdm) la présence d'une mutation de CSF3R a été associée à un pronostic défavorable (50).

Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3) est un récepteur à activité tyrosine kinase impliqué dans la régulation de la survie, de la prolifération et de la différenciation des cellules souches / progénitrices hématopoïétiques. Deux mutations peuvent survenir sur ce gène menant alors à la production d'un récepteur activé de manière constitutive : la mutation FLT3-ITD qui est une duplication en tandem au niveau de la partie juxta-membranaire (retrouvée chez 25% des patients) et la mutation FLT3-TKD qui est une mutation ponctuelle au niveau du domaine tyrosine kinase (retrouvée chez 5% des patients). Selon la charge allélique et son association ou non à une mutation de la NPM1, la présence d'une mutation FLT3-ITD est synonyme de pronostic favorable, intermédiaire ou défavorable (51). La mutation FLT3-TKD associée à la mutation de NPM1 est quant à elle considérée comme de pronostic favorable (52).

Tyrosine-protein kinase Kit ou CD117 (KIT) est un récepteur à activité tyrosine kinase exprimé sur la plupart des blastes. Son activation conduit à la phosphorylation et à l'activation des protéines de signalisation en aval, qui sont importantes pour la survie cellulaire et la prolifération. La mutation de KIT sur l'exon 17 est un facteur de mauvais pronostic chez les patients atteints de LAM porteurs de la protéine de fusion RUNX1-RUNX1T1, mais pas chez ceux porteurs de la protéine de fusion CBFβ-MYH11 (53). Par ailleurs l'augmentation de

l'expression de KIT est un facteur de mauvais pronostic dans les LAM nouvellement diagnostiquées (54).

RAS : les oncogènes RAS codent pour une famille de protéines associées à la membrane qui régulent la transduction du signal lors de la liaison à divers récepteurs membranaires. Ils jouent un rôle important dans la régulation de la prolifération, de la différenciation et de l'apoptose. Il existe 3 gènes RAS fonctionnels : NRAS, KRAS et HRAS. Leur mutation mène à leur activation de manière constitutive dans un état lié au GTP. Les mutations NRAS sont les mutations RAS les plus fréquentes chez les patients atteints de LAM (11% à 30% des patients). Une activité accrue de la voie RAS favorise une prolifération accrue et une diminution de la sensibilité à l'apoptose (55). La mutation d'U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1 (U2AF1) est un facteur de pronostic défavorable caractérisé par une survie globale courte et une mauvaise survie sans événement (56). En dehors des mutations, la surexpression de KRAS mais pas celle de NRAS est associée à un pronostic défavorable dans la LAM à caryotype normal (LAM-CN) (57).

Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11 (PTPN11) est une phosphatase qui régule la voie de signalisation RAS. Les mutations de PTPN11 sont associées à une survie globale plus courte et sont donc associées à un pronostic défavorable (58).

RAS-like GTP-binding (RIT1) est impliqué dans la régulation des cascades de signalisation dépendant de p38 MAPK liées au stress cellulaire. Les mutations de RIT1 sont associées à une survie globale plus courte (59).

1.7.3.1.3 Remodelage de la chromatine

Additional Sex Combs Like 1 (ASXL1) appartient à un groupe de complexes participant au remodelage de la chromatine. ASXL1 interagit notamment avec le complexe polycomb PRC2. Les mutations d'ASXL1 se caractérisent par des mutations hétérozygotes de type «frameshift» ou non-sens qui tronquent la protéine empêchant son interaction avec PRC2. La mutation d'ASXL1 favorise l'expression de gènes impliqués dans le maintien du phénotype indifférencié qui passe notamment par une augmentation de l'expression HOXA5-9. Les mutations d'ASXL1 sont associées à un pronostic défavorable (60).

BCL6 Co-repressor (BCOR) et **BCL6 Co-repressor Like 1 (BCORL1)** sont des gènes interagissant avec des histones désacétylases qui sont donc impliqués dans la régulation de la transcription. Ces gènes jouent un rôle essentiel dans l'hématopoïèse normale. Ces mutations sont associées à un pronostic défavorable (61).

1.7.3.1.4 Facteurs de transcription

CCAAT-/enhancer binding protein alpha (CEBPA) est un facteur de transcription impliqué dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Ce gène est régulé à la hausse pendant la différenciation granulocytaire et l'expression de CEBPA est suffisante pour déclencher la différenciation des neutrophiles. La mutation bi-allélique de CEBPA (CEBPAdm) est mutuellement exclusive avec la mutation de NPM1. Cette mutation est de pronostic favorable lorsqu'elle n'est pas associée à une mutation de FLT3-ITD. La mutation mono-allélique (CEBPAsm), quant à elle, n'a pas d'impact sur le pronostic lorsqu'elle n'est pas retrouvée avec une mutation de FLT3-ITD (62).

GATA binding protein 2 (GATA2) est un facteur de transcription indispensable pour l'hématopoïèse car il maintient le phénotype prolifératif des cellules progénitrices. Sa régulation négative est nécessaire pour la différenciation et donc l'expression de GATA2 est étroitement régulée par plusieurs facteurs de transcription tels que NOTCH1, PU.1 et EVI-1 ainsi que par les cytokines IL-1 et TNF α . Les mutations de GATA2 sont associées aux formes bi-alléliques de CEBPA (CEBPAdm). Les mutations de GATA2 sont préférentiellement retrouvées chez les femmes. Elles ont un impact favorable sur la survie (63).

RUNX Family Transcription Factor 1 (RUNX1) est un facteur de transcription qui forme un complexe avec le cofacteur CBF β . Ce complexe assure la stabilité de la protéine RUNX1 qui est impliquée dans la génération de cellules souches ainsi que dans la différenciation hématopoïétique. Il a été démontré que la perte de fonction de RUNX1 altère la différenciation entre les lignées myéloïdes et lymphoïdes favorisant le développement d'une leucémie. Les patients présentant une mutation de RUNX1 ont une survie globale et sans événement plus courte que les patients dépourvus de ce type de mutation (64).

1.7.3.1.5 Complexe de la cohésine

Le complexe de la cohésine est un complexe multifonctionnel régulant la cohésion des chromatides sœurs lors de la division cellulaire mais aussi la transcription des gènes et l'architecture de la chromatine. Dans les LAM, les mutations des protéines du complexe de la cohésine sont associées à un caryotype normal ce qui implique que leur impact sur la leucémogénèse n'est pas corrélé à leur fonction dans la cohésion des chromatides sœurs mais plutôt à leur rôle dans la médiation de l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription des gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation. Ce complexe se compose notamment des protéines Cohesin Complex Component (RAD21), Structural Maintenance Of Chromosomes 1A (SMC1A), Structural Maintenance Of Chromosomes 3 (SMC3), Stromal Antigen 2 (STAG2). La mutation de ces gènes est de bon pronostic tant du point de vue de la survie globale que de la survie sans événement (65,66).

1.7.3.1.6 Suppresseurs de tumeur

Plant Homeodomain Finger Protein 6 (PHF6) est une protéine impliquée dans la transcription. Les mutations de PHF6 sont préférentiellement retrouvées chez les hommes dans les formes les plus agressives de néoplasies myéloïdes et sont fréquemment associées aux mutations RUNX1 / IDH2 (67).

Tumor protein 53 (TP53) est un facteur de transcription assurant le maintien de la stabilité génomique qui est reconnu pour son rôle de suppresseur de tumeur. En réponse aux dommages à l'ADN, il active les programmes de réparation de l'ADN et déclenche l'arrêt du cycle cellulaire. Si le programme de réparation de l'ADN vient à faillir à sa tâche alors TP53 peut induire l'apoptose. Les différentes mutations de TP53 (faux-sens, non-sens, délétion/insertion, erreurs d'épissage) perturbent son domaine de liaison à l'ADN ou provoquent des changements de conformation conduisant à une fonction de TP53 gravement altérée. La mutation de TP53 est préférentiellement retrouvée chez les patients de plus de 60 ans et chez les patients avec un caryotype complexe. Compte-tenu de son rôle vis-à-vis de l'intégrité de l'ADN, une mutation de TP53 représente un mécanisme important de résistance aux chimiothérapies endommageant l'ADN. Une mutation de TP53 est donc de pronostic défavorable (68).

Wilms' tumor (WT1) est un facteur de transcription régulant l'expression de gènes impliqués dans la croissance cellulaire et le métabolisme. Bien que son rôle dans l'hématopoïèse ne soit

pas totalement élucidé, la perturbation de la fonction WT1 est actuellement considérée comme favorisant la prolifération des cellules souches et entravant la différenciation cellulaire. Dans les LAM à caryotype normal la mutation de WT1 engendre une survie sans événement plus courte (69). Il a également été rapporté que chez les patients présentant une double mutation WT1/FLT3-ITD la survie sans événement et la survie globale étaient diminuées (70).

1.7.3.1.7 NPM1

Nucleophosmin 1 (NPM1) est une protéine chaperonne qui transite entre le noyau et le cytoplasme et qui est impliquée dans de multiples fonctions telles que l'assemblage et le transport des protéines ribosomales, le contrôle de la duplication du centrosome et la régulation du suppresseur de tumeur ARF. La présence d'une mutation de NPM1 est de bon pronostic. En effet les patients porteurs de cette mutation ont en moyenne deux fois plus de chance d'obtenir une rémission complète par rapport aux patients ne présentant pas de mutation de NPM1. Cependant une association avec une mutation FLT3-ITD à charge allélique forte sera de pronostic intermédiaire tandis qu'une association à une mutation FLT3-ITD à faible charge allélique ne modifiera pas le pronostic favorable (29).

1.7.3.1.8 EVI-1

Ecotropic virus integration site-1 (EVI-1) est un facteur de transcription impliqué dans la modulation de l'expression de gènes régulant la différenciation cellulaire. Ses cibles moléculaires ne sont pas encore clairement définies. Une surexpression de EVI-1 est retrouvée chez 10% des patients adultes atteints de LAM. Cette surexpression est associée à une maladie particulièrement agressive de très mauvais pronostic avec une survie globale inférieure à 1 an pour 95% des patients (71).

1.7.3.1.9 Classement de l'impact pronostique

Le Tableau 3 résume l'impact pronostique des principales mutations retrouvées dans les LAM.

Impact pronostique		
<u>Favorable</u>	<u>Intermédiaire</u>	<u>Défavorable</u>
CEBPAdm sans mutation de GATA2 Complexe de la cohésine (RAD21, SMC1A, SMC3, STAG2) NPM1 NPM1 + FLT3-ITD à faible charge allélique NPM1 + FLT3-TKD IDH2	NPM1 + FLT3-ITD à charge allélique forte IDH1/2 selon l'association avec FLT3 et NPM1	DNMT3A IDH1 TET2 CSF3R NPM1 non-muté et FLT3-ITD à forte charge allélique RAS (mutation U2AF1) Surexpression de KRAS (LAM-CN) KIT (LAM <i>de novo</i>) PTPN11 RIT1 ASXL1 BCOR et BCORL1 RUNX1 PHF6 TP53 WT1 EVI-1

Tableau 3. Impact pronostique des principales mutations retrouvées dans les LAM

1.7.3.2 Les mutations non reliées à un impact pronostique

En dehors des mutations dont le rôle sur le pronostic a clairement été élucidé, d'autres anomalies moléculaires ont été décrites. Il s'agit de mutations affectant les gènes du complexe du spliceosome ainsi que d'autres gènes appartenant aux catégories fonctionnelles précédemment abordées.

1.7.3.2.1 Spliceosome

Les mutations des facteurs d'épissage sont particulièrement importantes dans les syndromes myélodysplasiques mais n'ont pas d'incidence pronostique dans les LAM. Parmi les gènes du spliceosome les plus fréquemment mutés se trouvent : Splicing Factor 3b Subunit 1 (SF3B1), Serine And Arginine Rich Splicing Factor 2 (SRSF2), U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1 (U2AF1), Zinc Finger CCCH-Type, RNA Binding Motif And Serine/Arginine Rich 2 (ZRSR2). La mutation de ces gènes entraîne l'expression dérégulée d'isoformes de plusieurs gènes (72).

1.7.3.2.2 Autres anomalies moléculaires

D'autres anomalies moléculaires ont également été décrites dans les LAM, cependant leur impact sur le pronostic vital ou l'évolution de la pathologie reste pour l'instant controversé. Parmi ces mutations on retrouve : Casitas B-cell lymphoma (CBL) qui est une ubiquitine ligase E3 impliquée dans la dégradation ubiquitine-dépendante de FLT3 (73) ; Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) qui est un gène suppresseur de tumeur qui régule la prolifération, la survie et la stabilité génomique (74) ; Nipped-B-like protein (NIPBL) qui est une protéine régulatrice du complexe de la cohésine (75) ; E26 transformation-specific variant 6 gene (ETV6) qui est l'un des gènes les plus régulièrement réarrangés dans la LAM et qui code un facteur de transcription hématopoïétique (76) ; GATA Binding Protein 1 (GATA1) qui est un facteur de transcription qui joue un rôle important dans le développement érythroïde (77) ; SET Binding Protein 1 (SETBP1) qui est impliqué dans le développement de syndromes myélodysplasiques et l'acutisation en LAM secondaire (78) ; l'histone lysine N-méthyltransférase (EZH2) qui participe au contrôle de la différenciation des CSH (79,80) ; Homologue B1 de l'oncogène viral du sarcome murin v-raf (BRAF) qui est une sérine/thréonine kinase impliquée dans la voie de signalisation RAS-MAP kinase (81) ; Janus kinase 2 (JAK2) qui est une tyrosine kinase jouant un rôle central dans la signalisation des cytokines et des facteurs de croissance (82).

Toutes les mutations évoquées précédemment sont recherchées en routine chez les patients atteints de LAM et sont regroupées au sein d'un panel. La découverte d'une mutation participe à l'orientation du diagnostic, à la mise en place de la stratégie thérapeutique, au suivi de la maladie résiduelle et enfin à la classification pronostique.

1.7.4 Classification European LeukemiaNet

L'intégration de l'ensemble des facteurs pronostiques énoncés précédemment a permis l'émergence de la classification European LeukemiaNet (ELN 2017) qui propose une stratification des LAM selon le pronostic de survie (2).

<u>Catégorie de risque</u>	<u>Anomalies génétiques</u>
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 NPM1 muté sans FLT3-ITD ou avec FLT3-ITD à faible charge allélique Mutation biallélique CEBPA
Intermédiaire	NPM1 muté et FLT3-ITD fortement présent NPM1 non-muté sans FLT3-ITD ou avec FLT3-ITD à faible charge allélique t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A Présence de toutes anomalies génétiques non classifiées comme favorables ou défavorables
Défavorable	t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 t(v;11q23.3); KMT2A réarrangé t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM (EVI-1) -5 ou del(5q); -7; -17/abn(17p) Caryotype complexe, caryotype monosomal NPM1 non-muté et FLT3-ITD à forte charge allélique RUNX1 muté ASXL1 muté TP53 muté

Tableau 4. Classification ELN (27).

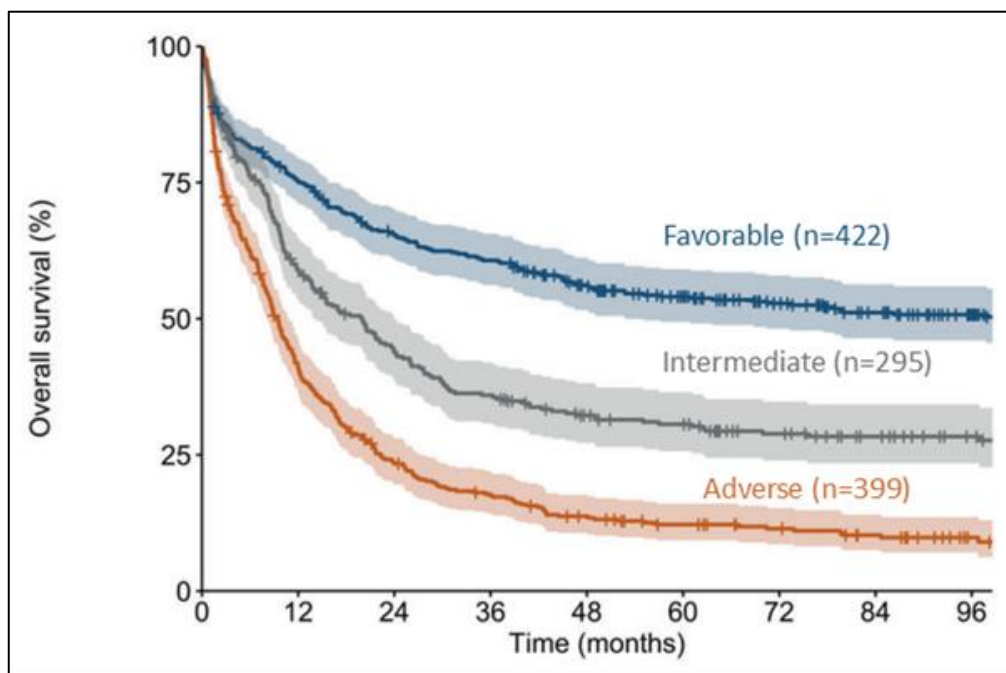


Figure 4. Courbe de survie selon la classification ELN appliquée à une large cohorte de patients (83).

Bien que la classification ELN constitue un outil intéressant pour stratifier les patients, elle trouve une certaine limite dans la précision de sa prédiction. En effet 3 ans après le diagnostic, un tiers des patients avec un profil favorable sont décédés tandis que dans le groupe à profil défavorable environ 20% des patients sont vivants (Figure 4). Il existe donc une marge de progression quant à la manière de classer les patients.

Comme le montrent les différents points abordés précédemment, l'utilisation des biomarqueurs prédictifs de réponse au traitement ou de la survie des patients sont de précieux alliés de la clinique dans les LAM. Ils ont en effet permis le développement d'une médecine personnalisée où les variations individuelles sont prises en compte pour établir la stratégie thérapeutique (84–86). Cependant le recours aux marqueurs moléculaires et cytogénétiques se heurte à une limite majeure résidant dans le fait que la présence d'une anomalie ne s'exprime pas obligatoirement au niveau du phénotype des cellules leucémiques. De plus les LAM sont des hémopathies multi-clonales où co-existent différents clones porteurs de sets de mutations hétérogènes dont les proportions peuvent varier dans le temps. **Il y a donc nécessité de développer, à côté de ces marqueurs génétiques, des marqueurs fonctionnels plus proches de la physiologie cellulaire. Ces travaux de thèse évalueront le rôle potentiel du métabolisme oxydatif mitochondrial comme biomarqueur pour le pronostic des LAM.**

1.8 Prise en charge thérapeutique des LAM

La prise en charge thérapeutique des LAM se compose de différentes phases de traitement. Elle consiste en une phase d'induction dont l'objectif est d'endiguer la prolifération des blastes puis d'une phase de consolidation ayant pour but de maintenir le taux de blastes au plus bas possible. Cependant tous les patients ne présentent pas un profil clinique permettant la mise en place de ce schéma thérapeutique, c'est le cas pour les sujets très âgés mais aussi pour les patients ne répondant pas aux premières cures. Ces patients présentant des formes complexes de LAM devront donc être traités avec d'autres stratégies thérapeutiques (27). Que ce soit dans le cadre de l'utilisation des thérapies conventionnelles ou non-conventionnelles, différents mécanismes de résistance ont été décrits et représentent une limite majeure dans l'efficacité des traitements. Seront ainsi abordés dans les parties suivantes les stratégies employées pour traiter les LAM ainsi que les différents mécanismes de résistance associés à ces traitements.

1.8.1 La phase d'induction

A l'exception des leucémies aiguës promyélocyaires traitées par acide rétinoïque tout-trans (ATRA), le traitement conventionnel des LAM repose sur l'association de cytarabine et d'anthracyclines telles que la daunorubicine. Ces deux molécules sont utilisées selon un schéma « 3+7 » : la daunorubicine (60 mg/m²) est prescrite pendant 3 jours et la cytarabine (100-200 mg/m²) pendant 7 jours. Ces chimiothérapies sont utilisées pour leurs propriétés antinéoplasiques cytostatiques. En effet la daunorubicine inhibe la topoisomérase II en s'intercalant entre deux paires de bases adjacentes de l'ADN tandis que la cytarabine, qui est un antimétabolite de la cytosine, inhibe les ADN polymérases α , δ and ϵ et provoque des cassures doubles brins induisant un stress oxydant pro-apoptotique (87).

1.8.2 La phase de consolidation

A l'issue de cette phase d'induction, 60 à 80% des patients atteignent une phase de rémission complète (CR) caractérisée par une présence blastique dans la moelle inférieure à 5%, une absence de corps d'Auer, une absence de blastes circulants, une numération des neutrophiles supérieure à $1 \times 10^9/L$, une numération plaquettaire supérieure à $100 \times 10^9/L$ et une indépendance à la transfusion de culots globulaires (88).

Les patients en phase de rémission reçoivent, à la suite de leur traitement d'induction, un traitement de consolidation qui repose essentiellement sur différentes cures de cytarabine afin de les préparer à une allogreffe. Pour les patients ne pouvant pas suivre un schéma thérapeutique conventionnel, et pour lesquels la possibilité de recourir à une allogreffe est exclue, les cures de cytarabine pourront être poursuivies. Il existe alors un risque de rechute important (30 à 80%) dû à l'apparition de forme réfractaire de la maladie.

Différents mécanismes peuvent mener à la résistance aux molécules utilisées dans le traitement chimio-thérapeutique des LAM. Parmi ces mécanismes, se distinguent des mécanismes de résistance primaire et secondaire.

1.8.2.1 Mécanismes de résistance primaire

Le principal mécanisme de résistance primaire aux chimiothérapies est lié à l'état de quiescence relatif des CSL. De fait, les CSL sont moins exposées à ce type de thérapie qui vise à la fois la synthèse et la réplication de l'ADN (89).

1.8.2.2 Mécanismes de résistance secondaire

Différents mécanismes de résistance secondaire ont par ailleurs été décrits chez les patients. C'est le cas de l'apparition de mutations ponctuelles (K798L et K798P) du gène hTOP2 au

niveau du site de fixation des anthracyclines qui les empêcheront de se lier à la Topoisomérase II. La surexpression de différentes protéines de détoxification va également participer à la résistance secondaire aux chimiothérapies. Parmi ces protéines, on retrouve les protéines transmembranaires capables d'expulser des agents antinéoplasiques membres de la superfamille des récepteurs Adénosine-triphosphate Binding Cassette (ABC) à savoir la p-glycoprotéine et la protéine Multidrug resistance-related protein (MRP1) dont la particularité est de coupler la GSH aux molécules qu'elle expulsera. En plus de ces deux protéines, la Lung resistance protein (LRP) participe également à la résistance face aux agents chimiothérapeutiques en bloquant leur import nucléaire et en favorisant leur exocytose par des mécanismes de coopération avec la p-glycoprotéine. Enfin la Glutathione S-transférase (GST) est également capable de participer à la résistance aux chimiothérapies. En effet cette enzyme catalyse la liaison de glutathion aux chimiothérapies ce qui les inactive (89).

Récemment, il a été montré que la modification du métabolisme mitochondrial des blastes était un mécanisme de résistance potentiel. L'équipe du Dr. Sarry a mis en évidence que les cellules persistantes, après traitement par la cytarabine, présentaient un métabolisme mitochondrial particulier caractérisé par une augmentation de la masse mitochondriale, une augmentation du potentiel de membrane mitochondriale, une production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) plus élevée et une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative. Ces travaux ont également démontré que l'inhibition du métabolisme mitochondrial par différentes approches, que ce soit en inhibant l'oxydation des acides-gras, l'activité de la chaîne respiratoire, la réplication de l'ADN mitochondrial ou encore la synthèse de protéines mitochondriales permettait de restaurer la sensibilité à la cytarabine aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (90). Cette même équipe a également démontré que les cellules devenues résistantes à la cytarabine présentaient une surexpression du CD39, une ectonucléotidase impliquée dans la dégradation de l'ATP extracellulaire. Aroua *et al.* ont ainsi mis en évidence qu'une activité CD39 élevée favorisait la résistance à la cytarabine en augmentant la consommation d'oxygène mitochondriale et la biogenèse par l'activation d'une réponse de stress mitochondrial adaptative médiée par l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). A l'aide d'approches génétiques et pharmacologiques, ils ont pu montrer que l'inhibition de l'activité ATPase de CD39 était suffisante pour bloquer la reprogrammation mitochondriale enclenchée en réponse à un traitement à la cytarabine ce qui a pour conséquence d'augmenter les effets cytotoxiques de cette molécule dans les blastes leucémiques aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (91).

1.8.3 Prise en charge des formes complexes

Pour faire face aux formes de LAM où la chimiothérapie ne peut être utilisée ou en cas d'échec de cette dernière, de nouvelles stratégies thérapeutiques ont été développées.

1.8.3.1 Thérapies utilisant de nouvelles formulations thérapeutiques

Le CPX-351 ou Vyxeos est une formulation liposomale incluant la daunorubicine et la cytarabine ayant démontré une efficacité chez les patients âgés de plus de 60 ans ayant déclaré une LAM suite à une myélodysplasie ou suite à un traitement (32).

Les agents déméthylants tel que la 5-azacytidine ou la décitabine (5-aza-2'-désoxycytidine) font partie d'une classe récente de chimiothérapie dont l'intérêt repose sur le rétablissement de l'expression de gènes ayant été hyperméthylés. Ces molécules sont des antimétabolites analogues de la cytidine dont le mécanisme d'action repose sur l'inhibition de la synthèse d'ADN et l'inhibition de l'ADN méthyltransférase (92).

1.8.3.2 Thérapies en relation avec le système immunitaire

En dehors des molécules de chimiothérapies, des traitements utilisant les propriétés du système immunitaire ont également été développés. C'est le cas du gemtuzumab ozogamicin dont la particularité est d'associer un anticorps anti-CD33, marqueur des cellules leucémiques myéloïdes, à la calichéamicine qui est un agent cytotoxique et dont le mécanisme d'action repose sur l'inhibition de la synthèse d'ADN et l'induction de l'apoptose (93).

Une résistance au gemtuzumab ozogamicin peut se développer suite à l'apparition d'une isoforme issue d'un épissage alternatif du CD33 ne comportant plus l'épitope ciblé par l'anticorps, par la présence de protéines impliquées dans la multirésistance aux drogues comme la p-glycoprotéine MDR1 ou encore par une compensation de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR menant à l'activation de voies anti-apoptotiques (94).

Parmi les thérapies utilisant les propriétés du système immunitaire pour lutter contre les LAM, on retrouve également les CAR-T cells (chimeric antigen receptor modified T-cells). Les CAR-T sont des lymphocytes T autologues ou allogéniques modifiés par ingénierie cellulaire pour qu'ils présentent un récepteur antigénique chimérique comportant un domaine de reconnaissance d'antigène permettant de cibler les cellules présentatrices de cet antigène. Suite à la formation de la synapse immunitaire entre la cellule cible et le CAR-T cell, les lymphocytes exercent leur fonction anti-tumorale notamment au travers du système perforine/granzyme et de l'induction de la voie Fas (95). L'efficacité de ce type de thérapie

impliquerait des modifications du métabolisme énergétique des lymphocytes T. En effet les CAR-T nécessitent un soutien métabolique spécifique garantissant leur prolifération, le maintien de leurs fonctions effectrices et la persistance de leur fonction mémoire. Il a par exemple été mis en évidence *in vivo* qu'une activité élevée de la phosphorylation oxydative mitochondriale favorisait la génération de lymphocytes T mémoire persistant sur une plus longue durée (96).

Les mécanismes de résistance aux CAR-T sont quant à eux liés à la capacité des LAM à échapper au contrôle du système immunitaire en favorisant l'activation de voies de signalisation anti-apoptotiques, en régulant à la baisse l'expression de l'antigène tumoral ciblé par le CAR-T, en inhibant l'activité cytotoxique des lymphocytes natural killer (NK cells), en induisant l'épuisement des lymphocytes T, en inhibant la formation de la synapse immunitaire ou encore en favorisant l'expansion des T-régulateurs (97,98).

1.8.3.3 Thérapies ciblées

Une problématique très importante dans les LAM est de cibler spécifiquement les cellules leucémiques en épargnant les cellules saines. Pour répondre à cet enjeu, différentes molécules ont été développées afin de cibler de manière spécifique des voies de signalisation essentielles à la survie et à la prolifération des cellules leucémiques.

1.8.3.3.1 FLT3-ITD et FLT3-TKD :

Afin de cibler les mutations de FLT3, différentes générations d'inhibiteurs ont été développées dans lesquels se classent le sorafenib, le quizartinib ou encore le crenolanib (51). Une limite majeure de l'utilisation des inhibiteurs de FLT3 en monothérapie est l'apparition de rechutes survenant dans les mois suivant la rémission initiale. Les mécanismes de résistance aux inhibiteurs de FLT3 sont multiples. L'utilisation d'inhibiteurs de FLT3 induit une pression de sélection sur la population cellulaire leucémique multiclonale qui peut mener à l'émergence de clones porteurs de mutations secondaires, notamment au niveau du domaine tyrosine kinase (FLT3-TKD), mais également à l'expansion de clones indépendants de FLT3-ITD portant d'autres mutations telles que TP53, IDH1/2, ASXL1, TET2 ou des mutations touchant la voie de signalisation des MAP kinases.

En plus de l'émergence de clones résistants, l'utilisation d'inhibiteurs de FLT3 peut mener au développement de mécanismes cellulaires adaptatifs qui contournent le blocage de FLT3. Ces mécanismes adaptatifs consistent en l'augmentation sérique de la concentration de FLT3-

ligand, en la modification de l'acidité intracellulaire par l'intermédiaire de la voie Tescalcin/NEH1 (sodium/hydrogen exchanger type 1) qui induit une alcalinisation du milieu intracellulaire, soutenant la prolifération et la survie, ou encore en l'augmentation de l'expression de protéines kinases comme les PIM kinases (proviral integration site for moloney murine leukaemia virus).

Le microenvironnement peut également jouer un rôle protecteur face aux inhibiteurs de FLT3 notamment par l'intermédiaire des cellules mésenchymateuses présentes au niveau de la moelle osseuse qui peuvent moduler l'expression de différentes cytokines afin de soutenir l'activation de voies de signalisation telles que la voie des MAP kinases ou celle des STAT. Les cellules mésenchymateuses sont également capables d'atténuer l'efficacité des inhibiteurs de FLT3 à l'aide des cytochromes P450 3A4 qui dégradent ce type de molécules (99).

Enfin, il a été montré que le métabolisme mitochondrial participait à la survie des cellules traitées avec des inhibiteurs de FLT3 et qu'une inhibition de la fonction énergétique des mitochondries à l'aide d'oligomycine A permettait d'éradiquer ces cellules. Cette association entre un inhibiteur de la FoF1 ATP-synthase et un inhibiteur de FLT3 induit une dépolarisation rapide de la membrane mitochondriale interne, provoque une crise énergétique caractérisée par une diminution du niveau d'adénosine-triphosphate (ATP) et favorise la production d'anions superoxydes (100). Par ailleurs il a été démontré que l'association d'inhibiteur de FLT3 avec une inactivation de la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PD) constituait une stratégie efficace pour éliminer les cellules leucémiques. En effet cette association engendre un bouleversement du métabolisme du carbone responsable de la perturbation de la synthèse de glutathion favorisant ainsi les effets pro-oxydants induits par les inhibiteurs de FTL3 (101).

1.8.3.3.2 IDH1 et IDH2

Les inhibiteurs d'IDH1/2 sont des inhibiteurs allostériques qui suppriment la production de 2HG et induisent une différenciation terminale (102).

Les mécanismes de résistance aux inhibiteurs d'IDH n'ont pas encore été totalement élucidés, toutefois des facteurs de résistance primaire ont été décrits. Il a en effet été montré que les CSL étaient plus résistantes aux inhibiteurs d'IDH. Par ailleurs, l'existence de co-mutations de RUNX1 ou des protéines impliquées dans la voie de signalisation des MAP kinases ont également été décrites comme des facteurs diminuant la sensibilité aux inhibiteurs d'IDH. Concernant les mécanismes de résistance acquis, les mutations de BCOR, RUNX1, KRAS et NRAS ont été associées à l'émergence de clones résistants (103). Il a également été démontré

chez plusieurs patients qu'une commutation d'isoforme muté entre IDH1 et IDH2 était possible et qu'elle menait à une résistance aux inhibiteurs d'IDH (104). Enfin il a récemment été démontré que l'association entre inhibiteurs d'IDH et inhibiteurs de la phosphorylation oxydative permettait d'augmenter l'efficacité des inhibiteurs d'IDH (105).

1.8.3.3 Venetoclax

Le venetoclax est un inhibiteur des protéines de la famille B-cell lymphoma-2 (BCL-2). Son mécanisme d'action passe par la restauration de l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose. Bien que le venetoclax ait montré une activité limitée en monothérapie, sa combinaison avec des agents pro-apoptotiques tels que les hypométhylants ou la cytarabine à faible dose, a démontré des taux de réponse élevés en particulier chez les sujets âgés ne pouvant pas recevoir de chimiothérapie d'induction intensive (106).

La résistance au venetoclax résulte d'une incapacité des cellules à exécuter l'apoptose provoquée par la perte de BAX ou de TP53 à la suite de leur mutation, une diminution de l'expression de BCL2 et/ou le recours à d'autres membres de la famille BCL2 tels que BCL2L1 (107). La résistance au venetoclax s'accompagne également de modifications de l'homéostasie mitochondriale et du métabolisme cellulaire. La présence des mutations FLT3-ITD, PTPN11, PMAIP1 (protéine pro-apoptotique) ainsi que la surexpression de MCL1 (protéine anti-apoptotique) ou la régulation à la hausse de la voie des MAP kinases ont également été associées à une résistance au venetoclax (108). La leucémie monocytaire (CD45⁺/CD117⁻/CD11b⁺/CD68⁺) se caractérise par des blastes présentant une résistance intrinsèque au venetoclax due à une répression de l'expression de BCL2 au profit de MCL1 (109).

Différentes approches de sensibilisation ou de rétablissement de la sensibilité au venetoclax ont été utilisées dans la littérature. Parmi ces approches, on retrouve des approches ciblant les métabolites contribuant à l'anaplérose du cycle de Krebs. En effet il a été démontré que l'association d'un inhibiteur du métabolisme de la glutamine, le CB-839, avec le venetoclax induisait à une inhibition de l'OXPPOS menant à une efficacité synergique sensibilisant les cellules leucémiques au venetoclax (110). Par ailleurs, il a été montré à partir de CSL issues de patients résistants à l'association entre le venetoclax et la 5-azacytidine que l'inhibition de la bêta-oxydation à l'aide de l'etomoxir, un inhibiteur de CPT-1, conduisait à l'effondrement de la phosphorylation oxydative permettant de resensibiliser les CSL à l'association venetoclax et 5-azacytidine (111). Enfin, il a été mis en évidence que l'inhibition de la traduction mitochondriale par le tedizolid était une approche efficace pour resensibiliser les

cellules devenues résistantes au venetoclax. L'association du tedizolid au venetoclax engendre une inhibition de la phosphorylation oxydative menant à la mise en place d'une réponse au stress (integrated stress response – ISR) impliquant les effecteurs eIF2 α et ATF4 qui activent un programme génique responsable de l'inhibition de la glycolyse provoquant alors un stress énergétique engendrant la mort cellulaire (112).

1.9 Rôle du métabolisme mitochondrial dans la résistance aux traitements.

Les différentes études abordées dans cette partie mettent ainsi en évidence le fait que le métabolisme des LAM, et en particulier le fonctionnement énergétique des mitochondries, est un des acteurs influençant la réponse aux thérapies antitumorales (chimiothérapies, inhibiteurs de FLT3, inhibiteurs d'IDH, inhibiteur de Bcl2). Puisque le métabolisme mitochondrial est impliqué dans la résistance aux traitements, il apparaît comme nécessaire de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques utilisables en clinique afin d'améliorer la prise en charge des patients en évaluant les caractéristiques de ce métabolisme (110,113). Il faut donc non-seulement être capable d'évaluer la phosphorylation oxydative mitochondriale de manière fiable mais également déterminer si ce métabolisme influence l'évolution de la LAM. La découverte de facteurs métaboliques liés à l'agressivité des LAM pourrait ainsi être utilisée afin de rendre compte, de manière prédictive, de l'efficacité des traitements ayant des effets métaboliques.

Cette thèse s'inscrit donc dans la continuité de cette problématique en s'intéressant à l'évaluation de la consommation d'oxygène mitochondriale des blastes en tant que biomarqueur pronostique de la survie des patients atteints de LAM.

2. Le métabolisme énergétique mitochondrial des LAM

Le métabolisme cellulaire repose sur l'interaction de nombreuses voies métaboliques cataboliques et anaboliques. Toutes ces réactions biochimiques fournissent à la cellule l'énergie et les précurseurs de macromolécules nécessaires à sa survie, ses fonctions et/ou à sa prolifération. Alors que le métabolisme des cellules différenciées privilégie la maximisation de la production d'énergie pour soutenir une ou des fonctions biologiques spécifiques ; le métabolisme des cellules en prolifération et notamment des cellules cancéreuses implique nécessairement un métabolisme anabolique accru pour soutenir la division cellulaire (114,115). Dans le cadre de cette thèse nous nous sommes principalement intéressés aux fonctions bioénergétiques mitochondriales des LAM qui s'articulent autour de la phosphorylation oxydative responsable de la consommation d'oxygène et de la glycolyse.

2.1 Organisation et dynamique mitochondriale

Ce que l'on désigne aujourd'hui comme « mitochondrie » est l'unité fonctionnelle qui compose le réseau mitochondrial. Il est possible d'observer cette unité fonctionnelle en réalisant une isolation de mitochondrie. Lors de cette isolation, les mitochondries vont s'individualiser sous une forme ovoïde (116).

L'ultrastructure mitochondriale est composée de deux membranes phospholipidiques séparées par un espace intermembranaire. Contrairement à la membrane mitochondriale externe, la membrane mitochondriale interne présente des crêtes. A l'intérieur de cette membrane mitochondriale interne se trouve la matrice mitochondriale contenant l'ADN mitochondrial mais également différentes enzymes cataboliques telles que celles impliquées dans le cycle de Krebs ou dans la bêta-oxydation des acides-gras. Par ailleurs de nombreuses enzymes et complexes enzymatiques sont associés aux membranes mitochondriales. Parmi ces derniers on retrouve les complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire, la FoF1 ATP-synthase ou encore différents transporteurs membranaires.

Au sein de la cellule, les mitochondries s'associent pour former un réseau tubulaire dynamique pouvant fusionner et fissionner (Figure 5). Ce réseau est capable de suivre les mouvements du cytoplasme et est sensible à son environnement. La dynamique du réseau mitochondrial est orchestrée par l'activité de protéines de fusion telles que OPA1 (optic atrophy 1), MFN1/2 (mitofusin-1/2) et par l'activité de protéines de fission telles que DRP1

(dynamamin-related protein 1), FIS1 (Mitochondrial fission 1 protein), MIEF1/2 (Mitochondrial Elongation Factor 1/2) et MFF (Mitochondrial fission factor) (117,118).

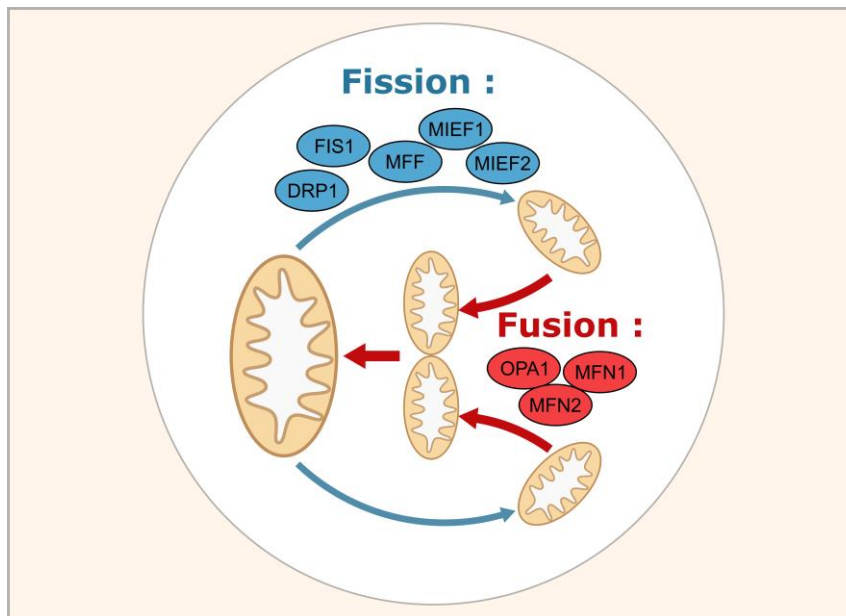


Figure 5. Schéma représentant la dynamique du réseau mitochondrial et ses principaux acteurs

Dans les CSH, le réseau mitochondrial est plutôt fragmenté avec des crêtes mitochondriales peu développées. Au cours de la différenciation hématopoïétique, le réseau mitochondrial mature et adopte une organisation tubulaire avec des crêtes mitochondriales développées qui reflètent l'augmentation de l'activité énergétique mitochondriale (119,120).

Dans les LAM, il a été montré par Pei *et al.* que les CSL surexprimaient des gènes impliqués dans la fission mitochondriale tel que FIS1. L'inhibition de cette expression de FIS1 dans les CSL engendre la diminution de la mitophagie ce qui provoque l'accumulation de mitochondries altérées. De plus la perte de l'expression de FIS1 réduit les capacités souches des CSL en diminuant notamment l'activité de GSK3 β et favorise la différenciation des CSL (121).

2.2 Métabolisme énergétique des cellules hématopoïétiques saines ou leucémiques.

2.2.1 Métabolisme énergétique des cellules hématopoïétiques saines.

2.2.1.1 Cellules souches hématopoïétiques

Le premier phénotype métabolique cellulaire correspond à celui des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ces cellules reposent dans un état relatif de quiescence. Etant peu prolifératives, elles présentent des besoins métaboliques amoindris qui se traduisent par un hypométabolisme (122). Par ailleurs, ces cellules résident dans la moelle osseuse qui est un microenvironnement hypoxique conditionnant ainsi leur métabolisme. Il a ainsi été mis en évidence que les CSH expriment des niveaux élevés de facteur 1 alpha inductible par l'hypoxie (HIF1 α). Au niveau cellulaire, HIF1 α soutient l'expression des pyruvates déshydrogénases kinases 2 et 4 (PDK2 et 4) ce qui favorise le métabolisme glycolytique des CSH. Ainsi la glycolyse anaérobie est la principale source d'énergie des CSH. L'inhibition de l'expression d'HIF1 α , de PDK2 ou de PDK4 est suffisante pour entraîner une perte de la quiescence des CSH et leur faire perdre leur potentiel de cellules souches (123,124). En parallèle, la phosphorylation oxydative mitochondriale serait essentielle au maintien de la quiescence des CSH. En effet, il a été montré dans un modèle murin que la délétion d'une sous-unité du complexe III de la chaîne respiratoire entraînait une perte de la quiescence des CSH (125). D'autres voies métaboliques sont également importantes dans les CSH. C'est le cas du métabolisme de la glutamine. Il a été mis en évidence qu'une augmentation des niveaux d'expression des L-glutaminases (GLS) était nécessaire pour soutenir la prolifération des CSH engagées dans la sortie de l'état de quiescence (126).

Les CSH sont particulièrement sensibles au stress oxydatif et présentent de faibles niveaux de ROS endogènes (127). Le métabolisme des CSH change drastiquement au cours de leur activation et de leur engagement dans la différenciation hématopoïétique. Les CSH passent ainsi d'une dépendance énergétique liée à l'activité glycolytique à une dépendance liée à la phosphorylation oxydative mitochondriale qui s'accompagne par une augmentation du niveau de stress oxydant intracellulaire (128). Le métabolisme des acides-gras est également important dans le maintien du phénotype souche des CSH. En effet il a été mis en évidence que la voie PML - PPAR- δ (récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes) - FAO (oxydation des acides gras) participait à la maintenance des capacités d'auto-renouvellement des CSH et contrôlait également la division asymétrique des CSH. L'inhibition de

l'expression de PML, de PPAR- δ ou de l'oxydation des acides-gras entraîne l'engagement des CSH dans une division cellulaire symétrique tandis que l'activation de PPAR- δ augmente la division cellulaire asymétrique (129).

2.2.1.2 *Progéniteurs hématopoïétiques*

Le second phénotype métabolique cellulaire est celui des progéniteurs hématopoïétiques. Ce phénotype métabolique répond aux besoins de cellules fortement prolifératives. Il se caractérise par une avidité plus importante pour la captation de nutriments qui est nécessaire pour soutenir les besoins anaboliques et énergétiques des cellules en prolifération. Par exemple, il a été montré qu'au cours de la différenciation des cellules dendritiques sous l'influence de FLT3-ligand, l'expression du CD71 (récepteur de la transferrine), du CD98 (glycoprotéine impliquée dans le transport d'acide aminé neutre) et de GLUT1 (transporteur du glucose) était augmentée (130). Cependant les connaissances sur le métabolisme des progéniteurs hématopoïétiques sont modestes, tant du fait de la diversité des progéniteurs que de l'approche méthodologique à employer pour les purifier afin de les étudier.

2.2.1.3 *Cellules hématopoïétiques différenciées.*

Le dernier phénotype métabolique rencontré est celui des cellules hématopoïétiques différenciées. Ces cellules ne proliférant plus, elles présentent différents types de métabolisme énergétique principalement conditionnés par la fonction cellulaire qu'elles assurent. Il a ainsi été décrit que selon leur modalité d'activation, les monocytes pouvaient adopter un métabolisme préférentiellement glycolytique dans le cadre d'une différenciation en macrophage pro-inflammatoire (type M1) ou au contraire favoriser la phosphorylation oxydative si le monocyte s'oriente vers un phénotype macrophagique anti-inflammatoire (type M2). Les lymphocytes en quiescence utilisent principalement la phosphorylation oxydative pour répondre à leurs besoins énergétiques. Toutefois, en cas d'activation, les lymphocytes augmentent à la fois leur fonction glycolytique et leur consommation d'oxygène mitochondriale. Cette augmentation globale des processus énergétiques est essentielle afin que les lymphocytes puissent assurer leurs fonctions immunologiques, qui incluent l'expansion clonale, la production de cytokines et d'anticorps. Le métabolisme énergétique des neutrophiles repose quant à lui essentiellement sur la glycolyse. En effet, les neutrophiles ne présentent que très peu de mitochondries. Afin d'assurer leur agrégation, les plaquettes augmentent à la fois leur métabolisme glycolytique et leur phosphorylation oxydative

(131,132). Enfin le métabolisme des érythrocytes repose uniquement sur la glycolyse pour leur fonction énergétique puisqu'au cours de leur différenciation leurs mitochondries sont éliminées par autophagie (133).

Ces différents exemples démontrent ainsi la diversité des types de métabolismes énergétiques retrouvés chez les cellules hématopoïétiques différenciées. Ils montrent également que les cellules hématopoïétiques saines présentent différents comportements métaboliques conditionnés par leur phénotype cellulaire (Figure 6).

En plus d'être sous l'influence du type cellulaire, le métabolisme des cellules hématopoïétiques varie également en fonction de l'âge. En effet il a été montré que les monocytes issus de sujets sains âgés de 60 à 80 ans présentaient une phosphorylation oxydative plus faible que ceux issus de sujets sains âgés de 18 à 35 ans (134).

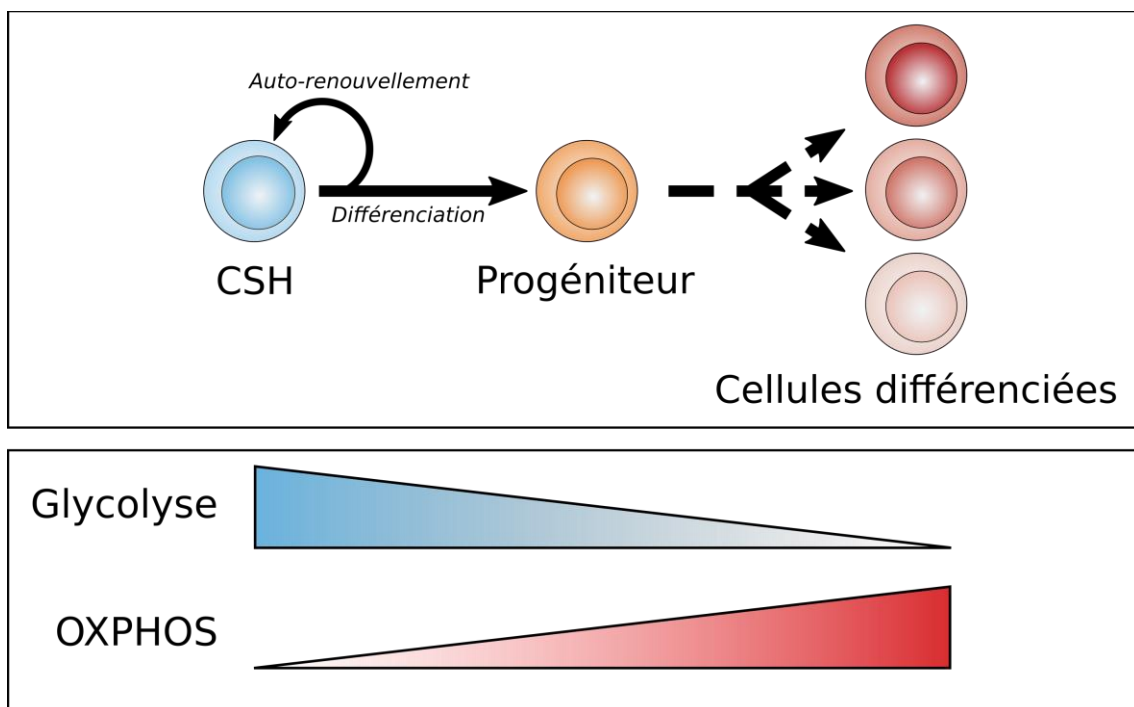


Figure 6. Evolution métabolique des cellules hématopoïétiques au cours de la différenciation.

2.2.2 Métabolisme énergétique des cellules leucémiques

2.2.2.1 Cellules souches leucémiques (CSL)

Dans les LAM, le métabolisme des CSL est totalement différent de celui des CSH. En effet, contrairement aux CSH, pour soutenir leur fonction énergétique, les CSL sont dépendantes de leur phosphorylation oxydative car elles ne peuvent pas augmenter leur glycolyse de façon significative en réponse à une demande énergétique (Figure 7) (15). Cette dépendance à la phosphorylation oxydative est indispensable à la survie des CSL. En outre, comparativement aux autres cellules leucémiques, les CSL se distinguent par leur hypométabolisme caractérisé par une faible activité glycolytique, une faible activité de leur chaîne respiratoire mitochondriale et un niveau de stress oxydant réduit (16,17). En raison de la diminution de l'activité glycolytique, les CSL produisent peu de pyruvate. Afin de garantir l'anaplérose du cycle de Krebs, les CSL oxydent les acides aminés et les acides-gras.

Il a été mis en évidence que les CSL étaient dans un état « pseudo-hypoxique » constant. En effet, il a été montré que HIF1 α était activé même en normoxie, permettant la génération et le maintien des CSL. Cependant, la fonction de HIF1 α dans les CSL n'a pas encore été complètement élucidée. Une étude récente a suggéré que HIF1 α exerçait un contrôle transcriptionnel sur la glycolyse mais pas sur la phosphorylation oxydative dans les cellules leucémiques. Par ailleurs il a été montré que l'inhibition de l'expression d'HIF1 α dans les cellules leucémiques n'affectait pas la consommation de glucose ou la production de lactate, suggérant que la régulation glycolytique se produit indépendamment de HIF1 α . Par ailleurs, cette inhibition de l'expression de HIF1 α dans les LAM, induite par MLL-AF9, accélère la progression de la maladie après chimiothérapie (18).

Puisque d'un point de vue énergétique, les CSL dépendent uniquement de la phosphorylation oxydative, qui est une source majeure de stress oxydant, il est crucial pour la survie des CSL de maintenir un niveau de stress oxydant relativement faible. Il a d'ailleurs été mis en évidence que la mesure du niveau de ROS pouvait être utilisé comme un outil pour identifier et isoler les CSL du reste de la population blastique (15). Afin de faire face aux effets toxiques des ROS, les CSL utilisent notamment la protéine kinase AMP-dépendante (AMPK). Cette kinase active FIS1 qui est un régulateur de la fission mitochondriale participant à la clairance des mitochondries endommagées par les ROS. L'inhibition de FIS1 induit une réduction de la mitophagie, une augmentation de la différenciation myéloïde, l'arrêt du cycle cellulaire et l'inhibition de la glycogène synthase kinase-3 (GSK3) une sérine/thréonine protéine kinase dont la signalisation est essentielle au potentiel d'auto-renouvellement des

CSL. L'inhibition de l'AMPK produit des résultats similaires à ceux observés lors de l'inhibition de FIS1. En plus d'activer FIS1, l'AMPK phosphoryle également Ulk1 qui contribue à l'adressage des mitochondries au lysosome. Ensemble, ces données suggèrent que FIS1 régule de manière critique la mitophagie et que les CSL utilisent la mitophagie médiée par AMPK/FIS1 comme mécanisme de survie face aux dommages provoqués par le stress oxydant (135,136). De plus, il a été mis en évidence que chez 40% des patients atteints de LAM, les facteurs de transcription Forkhead box protein (FOXO) étaient surexprimés. Or ces facteurs et notamment FOXO3a sont impliqués dans la régulation du stress oxydant car ils contrôlent l'expression de la superoxyde dismutase (SOD2), qui convertit les radicaux superoxydes en oxygène et en peroxyde d'hydrogène. L'expression de FOXO3a favorise également l'autophagie permettant ainsi d'atténuer les effets nocifs liés au stress oxydant en éliminant les protéines altérées et les mitochondries endommagées (137,138).

2.2.2.2 *Cellules leucémiques en prolifération*

La reprogrammation métabolique est un phénomène commun des cellules cancéreuses car elle soutient la croissance et la prolifération. Chez les patients atteints de LAM, les mutations jouent un rôle déterminant dans cette reprogrammation métabolique. Tout d'abord, et comme c'est le cas dans de nombreux cancers, il a été mis en évidence que la glycolyse était exacerbée dans les LAM (139,140). Récemment, Ye *et al.* ont montré que les cellules leucémiques étaient également capables d'induire des modifications du métabolisme à l'échelle de l'hôte. Ils ont mis en évidence que les cellules leucémiques présentaient une augmentation importante (jusqu'à 20 fois) de la consommation de glucose par rapport aux CSH. Par ailleurs ils ont découvert que ces cellules manipulaient plusieurs tissus hôtes pour assurer des concentrations élevées de glucose dans la moelle osseuse. Les effets observés impliquent l'augmentation de la résistance périphérique à l'insuline et l'inhibition de la sécrétion d'insuline due notamment à la production d'IGFBP1 (Insulin-like growth factor-binding protein 1) par le tissu adipeux et de GLP-1 (Glucagon-like peptide 1) par les cellules entéro-endocrines (L-cells) (141). Des mutations telles que FLT3-ITD ou EVI-1 favorisent et soutiennent cette augmentation de la glycolyse (142,143). En effet, la mutation FLT3-ITD provoque une augmentation de la glycolyse aérobie en favorisant l'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT induisant ainsi l'expression de l'hexokinase mitochondriale (HK2). Par ailleurs, d'autres voies métaboliques sont également dérégulées. C'est le cas du métabolisme lipidique dont la reprogrammation a été associée à la mutation d'IDH1 qui dérégule les voies liées aux acides-gras afin de soutenir l'anabolisme lipidique (144). Enfin, la

présence d'une mutation de NPM1 favorise l'expression de la pyruvate kinase M2 (PKM2) qui soutient la survie cellulaire ainsi que l'activité autophagique (145). **A ce jour il n'existe pas d'études comparatives concernant le métabolisme des progéniteurs hématopoïétiques et celui des non-CSL.**

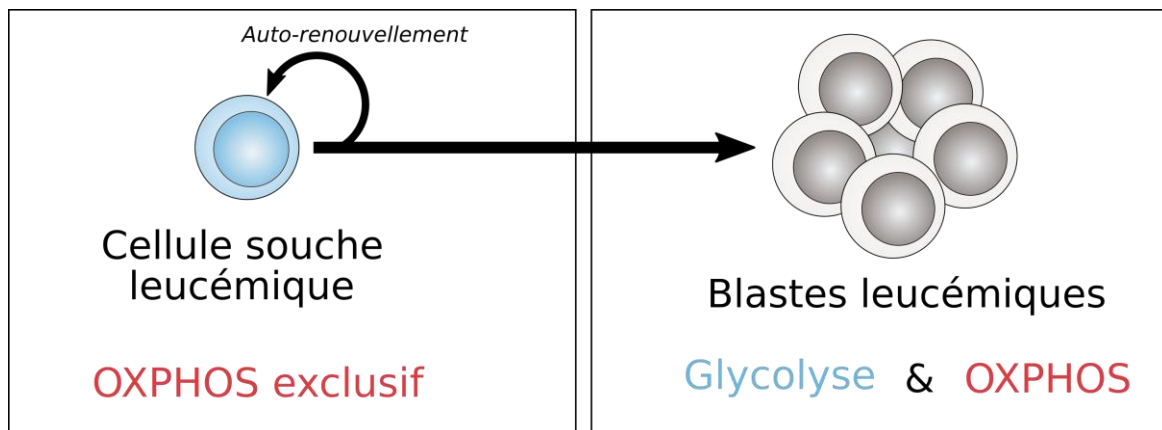


Figure 7. Processus métaboliques actifs au sein des cellules souches leucémiques et des blastes leucémiques.

2.3 Acteurs moléculaires du métabolisme énergétique des LAM

2.3.1 Le cycle de Krebs.

Afin de régénérer de l'ATP, les cellules peuvent cataboliser des nutriments (glucose, acides gras ou acides aminés) par la voie oxydative. Ce processus fournira des intermédiaires qui seront importés au sein des mitochondries pour rejoindre le cycle de Krebs. Ces réactions d'oxydo-réductions permettront de générer du NADH et du FADH₂ qui seront respectivement donneurs de deux électrons au complexe I et au complexe II. Au sein de ce chapitre seront ainsi abordées les généralités sur le métabolisme énergétique mitochondrial ainsi que ses particularités dans les LAM.

2.3.1.1 L'anaplérose du cycle de Krebs

Différentes voies métaboliques assurent l'approvisionnement du cycle de Krebs en substrat : la glycolyse, la bêta-oxydation des acides gras et le catabolisme des acides-aminés constituent les trois principales voies impliquées dans l'anaplérose du cycle de Krebs.

2.3.1.1.1 Le catabolisme du glucose

2.3.1.1.1.1 La glycolyse

La glycolyse correspond au processus métabolique par lequel le glucose (composé de 6 carbones) est décomposé en deux molécules de pyruvate (composées de 3 carbones). Cette réaction prend place dans le cytosol et mène à la régénération de deux molécules d'adénosine-triphosphate (ATP) et à la réduction d'une molécule de nicotinamide adénine (NAD⁺). La glycolyse débute par l'absorption du glucose qui est médiée par les transporteurs transmembranaires du glucose (GLUT). Dans les LAM, il a été montré qu'il existait une association entre la surexpression de GLUT1 et une faible sensibilité aux chimiothérapies (146). Il a également été montré chez les patients au diagnostic que l'ARN long non codant ANRIL (antisense noncoding RNA in the INK4 locus) était régulé à la hausse par rapport aux sujets sains et aux patients en rémission complète. L'inhibition d'ANRIL provoque la sénescence de lignées cellulaires de LAM et réduit l'agressivité de ces lignées *in vivo*. Au niveau moléculaire, ANRIL favorise l'expression de GLUT1 et promeut le métabolisme du glucose par un mécanisme impliquant le récepteur à l'adiponectine 1 (AdipoR1), l'adénosine monophosphate-kinase (AMPK α) et la sirtuine-1 (SIRT1) (147).

En plus de leur avidité pour le glucose, les LAM utilisent également le fructose, un autre hexose pouvant être utilisé pour la glycolyse. Il a en effet été mis en évidence que les lignées cellulaires de LAM pouvaient surexprimer le transporteur de fructose GLUT5 dans des conditions de culture en présence d'une faible concentration de glucose. Par ailleurs, la surexpression du gène SLC2A5 codant pour GLUT5 est associée à un pronostic défavorable chez les patients (148).

Suite à cette entrée dans le cytosol, le glucose est immédiatement phosphorylé par l'hexokinase (HK-2) en glucose-6-phosphate (G6P). L'activité d'HK-2 est sous la dépendance de la voie de signalisation PI3K/Akt. Cette voie étant particulièrement activée en présence de la mutation FLT3-ITD, il a été mis en évidence que les cellules leucémiques porteuses de cette anomalie moléculaire étaient particulièrement dépendantes de la glycolyse. Ainsi l'utilisation d'inhibiteur de FLT3-ITD tel que le sorafenib entraîne un effet cytotoxique caractérisé par une inhibition précoce de l'activité glycolytique conduisant à une diminution de la quantité d'ATP (142).

Selon les besoins cellulaires, le G6P rejoindra la voie anabolique des pentoses phosphates pour permettre la synthèse d'histidine et de nucléotides ou sera transformé en pyruvate. Ces voies connexes de la glycolyse sont abordées au sein de la revue publiée par Kreitz *et al.* (149).

Le pyruvate peut être transformé en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH). La transformation du pyruvate en lactate par la LDH est accompagnée par l'oxydation de NADH en NAD⁺. Cette oxydation du NADH est nécessaire au maintien d'un flux glycolytique élevé. Le lactate est ensuite expulsé dans le milieu extracellulaire par l'intermédiaire de transporteurs des mono-carboxylates (MCT). Cette sortie du lactate est couplée à la sortie de proton ce qui engendrera une acidification extracellulaire (150). Cette acidification peut être évaluée par diverses sondes fluorimétriques permettant d'évaluer l'activité de la glycolyse (ex : technologie XFe Seahorse). Dans les LAM, la surexpression de MCT4 est associée à un mauvais pronostic. Par ailleurs il a été montré que l'inhibition de MCT1 ou MCT4 induisait un effet antiprolifératif (151).

Alternativement à sa transformation en lactate, le pyruvate peut également rejoindre le cycle de Krebs pour subir la décarboxylation oxydative qui aura lieu au sein de la mitochondrie.

2.3.1.1.1.2 L'import mitochondrial du pyruvate

L'entrée du pyruvate au niveau de la matrice mitochondriale est sous la dépendance du transporteur mitochondrial pyruvate carrier (MPC) (Figure 8). Le MPC est composé de deux sous-unités MPC1 et MPC2 ayant été décrites dans la littérature comme pouvant s'oligomériser pour former un transporteur fonctionnel (152). A la suite de son entrée dans la matrice mitochondriale, le pyruvate sera incorporé au cycle de Krebs soit par le complexe de la pyruvate déshydrogénase (PDH) qui décarboxyle le pyruvate et l'associe à une co-enzyme A (CoA) pour donner de l'acétyl-CoA ; soit par la pyruvate carboxylase (PC) qui l'incorpore au niveau de l'oxaloacétate en utilisant de l'ATP (149). Il a été mis en évidence dans des lignées cellulaires de LAM qu'en réponse à un stress oxydant la PC participait à la transformation du pyruvate en oxaloacétate qui sert ensuite à la synthèse de malonate. Cette conversion en malonate entraîne non seulement une perturbation du cycle de Krebs *via* l'épuisement de l'oxaloacétate mais contribue en plus à inhiber l'activité de la succinate déshydrogénase (SDH). En effet le malonate est un analogue du succinate qui ne pourra pas être métabolisé par la SDH en fumarate. Par ce mécanisme d'action la PC participe donc à diminuer l'activité du cycle de Krebs et par conséquent celle de la chaîne respiratoire ce qui constitue un mécanisme de résistance face à la production de stress oxydant par la phosphorylation oxydative (153).

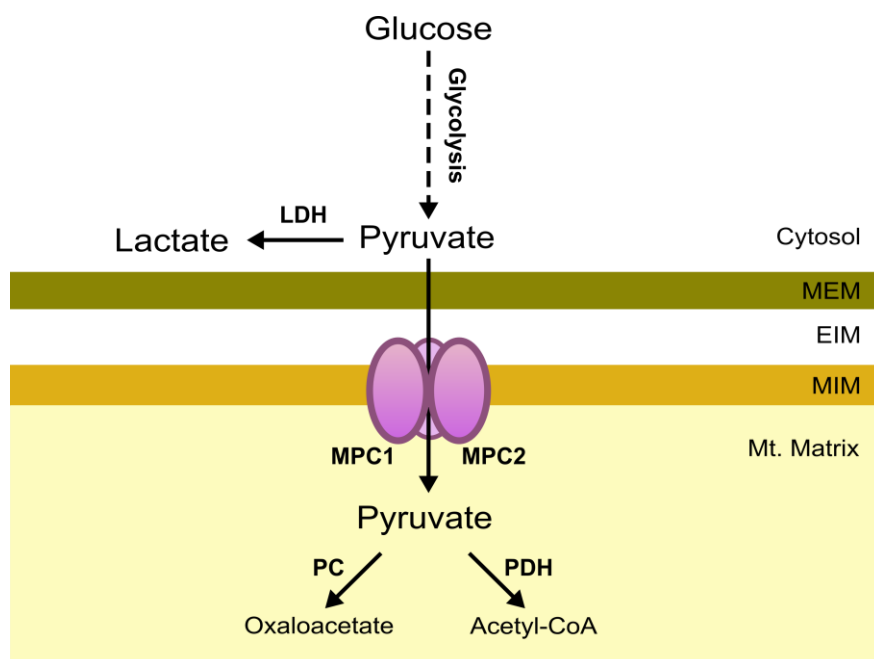


Figure 8. Schéma représentant les différentes voies cataboliques du pyruvate. LDH : lactate déshydrogénase ; MPC : Mitochondrial pyruvate carrier ; PC : pyruvate carboxylase ; PDH : pyruvate déshydrogénase ; MEM : membrane mitochondriale externe ; EIM : espace intermembranaire mitochondrial ; MIM : membrane mitochondriale interne ; Mt Matrix : matrice mitochondriale.

Le complexe de la PDH est un complexe multienzymatique constitué de trois composants catalytiques : (i) la pyruvate déshydrogénase (E1) catalysant la décarboxylation du pyruvate suivie d'une acétylation réductrice de fragments lipoyles liés de manière covalente à la dihydrolipoamide acétyltransférase (E2), le deuxième composant catalytique du complexe ; (ii) E2 catalysant la formation d'acétyl-CoA ; et (iii) la dihydrolipoamide déshydrogénase (E3) réoxydant les fragments lipoyles réduits de E2 permettant également la réduction de NAD^+ en NADH (154).

Comme le montre la Figure 9, l'activité du complexe de la PDH est finement régulée. En effet selon l'état des réserves énergétiques cellulaires la PDH pourra être inactivée, comme c'est le cas lorsque le ratio ATP/ADP ou NADH/NAD^+ est élevé. Cette inactivation passe par la phosphorylation de sérines (S232, S293, S300) situées au niveau de la sous-unité E1 du complexe par les pyruvates déshydrogénases kinases 1-4 (PDK). Si les réserves énergétiques diminuent alors la PDH pourra être déphosphorylée par les pyruvates déshydrogénases phosphatases 1-2 (PDP) ce qui permet de rendre la PDH de nouveau active (155). Dans des lignées cellulaires de LAM, il a été montré que l'inhibition de la pyruvate déshydrogénase kinase 1 (PDK1) par le dichloroacétophenone induisait l'apoptose des cellules leucémiques et ralentissait le développement tumoral dans un modèle de xénogreffe. Il a également été montré que les patients surexprimant PDK2 et PDK3 présentaient un plus mauvais pronostic

vital (156,157). Au travers de ces différentes publications, il a donc été mis en évidence le rôle majeur de la glycolyse et de la régulation de la décarboxylation oxydative du pyruvate dans les LAM.

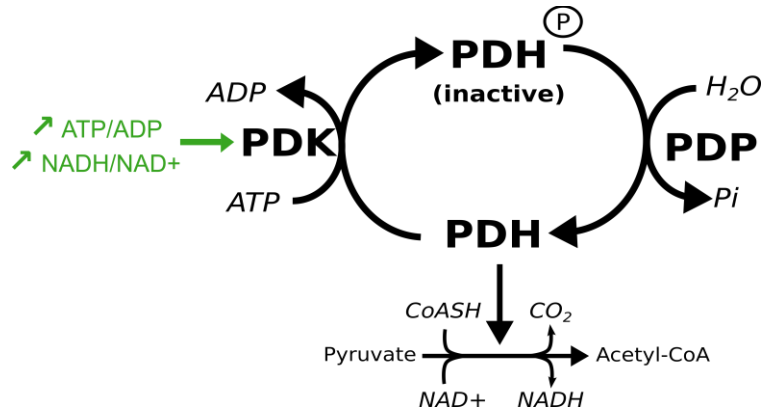


Figure 9. Schéma représentant la régulation du complexe de la PDH. PDH : pyruvate déshydrogénase ; PDK : pyruvates déshydrogénases kinases ; PDP : pyruvates déshydrogénases phosphatases.

2.3.1.1.2 Les acides aminés

Dans les LAM, différentes altérations du métabolisme des acides aminés ont été décrites. Ces acides aminés participent à la fois à la synthèse des protéines et aux réactions de biosynthèse de métabolites.

2.3.1.1.2.1 La glutamine

La glutamine rejoint le cycle de Krebs à la suite de deux réactions enzymatiques successives : d'abord la glutamine est convertie en glutamate par la glutaminase (GLS), puis le glutamate est transformé en α -cétoglutarate par la glutamate déshydrogénase (GDH). Cette dernière réaction permettra la régénération de NADH (Figure 10).

La présence de la mutation MLL-AF9 et la surexpression d'EVI1 dans les LAM ont été décrites comme soutenant l'anaplérose du cycle de Krebs en augmentant l'incorporation de glutamine liée à la surexpression de SLC1A5 (Solute Carrier Family 1 Member 5). Dans ce contexte, l'utilisation de la L-asparaginase, une enzyme capable de transformer la glutamine extracellulaire en glutamate empêchant alors son incorporation au niveau cellulaire, a montré une efficacité importante dans l'induction de la mort cellulaire et dans l'inhibition de la croissance tumorale (143). Par ailleurs l'utilisation du CB-839, un inhibiteur de la GLS, dans des lignées cellulaires et des cellules issues de patients porteurs de mutations IDH1 ou IDH2 a

non seulement démontré les mêmes propriétés mais a également montré un effet pro-différenciateur (158). Enfin, l'équipe du Pr. Bouscary a démontré que l'inhibition de la glutaminolyse en association avec le venetoclax induisait un effet synergique (110).

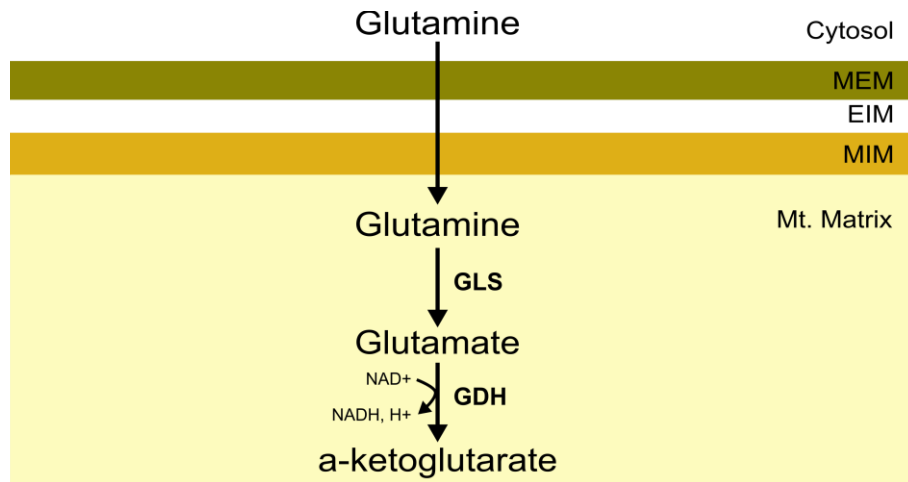


Figure 10. Schéma représentant les étapes clés de la glutaminolyse. GLS : glutaminase ; GDH : glutamate déshydrogénase ; MEM : membrane mitochondriale externe ; EIM : espace intermembranaire mitochondrial ; MIM : membrane mitochondriale interne ; Mt Matrix : matrice mitochondriale

2.3.1.1.2.2 Les autres acides-aminés

Les acides aminés à chaîne latérale ramifiée (BCAA) (valine, isoleucine, leucine) sont transférés dans les cellules par l'intermédiaire de l'aminotransférase à chaîne ramifiée 1 (BCAT1). Il a été montré que BCAT1 était surexprimée dans la LAM et qu'elle favorisait la croissance des cellules leucémiques. Par ailleurs son inhibition favorise la différenciation des myéloblastes en myélocytes (159).

Le métabolisme de la méthionine est également dérégulé dans les LAM et participe au maintien de la méthylation de l'ADN des cellules leucémiques présentant l'anomalie moléculaire MLL (160).

Enfin il a été mis en évidence que les CSL dépendaient de l'utilisation des acides-aminés à la fois pour leur survie et pour l'approvisionnement métabolique de leur phosphorylation oxydative. Cependant cette dépendance semble être uniquement retrouvée chez les patients avec une LAM *de novo*, puisque les CSL issus de patients en rechute montrent quant à elles une dépendance aux acides-gras (161).

2.3.1.1.3 Le métabolisme des acides-gras

Les acides gras peuvent également rejoindre le cycle de Krebs par l'intermédiaire de la bêta-oxydation. Au niveau du cytosol la carnitine palmitoyltransferase I (CPT-I) permet l'import d'acyl-carnitine dans l'espace intermembranaire mitochondrial (Figure 11). L'acyl-carnitine est ensuite transloquée dans la matrice mitochondriale par la carnitine acyl-carnitine translocase (CACT). La carnitine palmitoyltransferase II catalysera alors l'échange de la carnitine contre une CoA sur l'acyl. Par l'action de thiolase, l'acyl-CoA pourra alors donner de l'acétyl-CoA qui pourra être incorporé au cycle de Krebs par la citrate synthase (162).

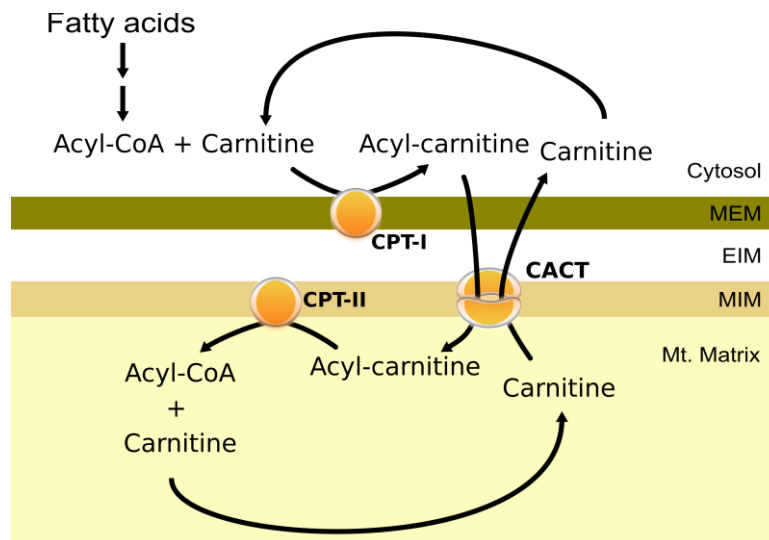


Figure 11. Schéma représentant les étapes clés de la bêta-oxydation. CPT-I : carnitine palmitoyltransferase I ; CACT : carnitine acyl-carnitine translocase ; CPT-II : carnitine palmitoyltransferase II ; MEM : membrane mitochondriale externe ; EIM : espace intermembranaire mitochondrial ; MIM : membrane mitochondriale interne ; Mt Matrix : matrice mitochondriale.

Il a été mis en évidence que l'inhibition pharmacologique de la bêta-oxydation par l'etomoxir (inhibiteur de CPT-I) ou la ranolazine (inhibiteur de la 3-ketoacyl CoA thiolase) inhibe la prolifération et sensibilise les cellules leucémiques à l'induction de l'apoptose par l'ABT-737 (un inhibiteur de Bcl2) ou par la cytarabine (163). Par ailleurs, le traitement des cellules issues de patients atteints de LAM avec de l'etomoxir a été montré comme efficace pour réduire la quantité de CSL *ex vivo*. Il a également été montré que la perturbation de la bêta-oxydation par l'avocatine B induisait une réponse apoptotique dépendante de CPT-I (164). L'association thérapeutique entre la cytarabine et l'avocatine B a également montré un effet synergique dans l'induction de la mort cellulaire de lignée de LAM dans un contexte de co-culture avec des adipocytes de la moelle osseuse (165). Enfin il a été mis en évidence que l'inhibition de

l'expression de CPT-I dans des blastes issus de patients atteints de LAM diminuait l'agressivité des cellules leucémiques lors de xéno-greffe (166).

2.3.1.2 Les réactions d'oxydo-réductions du cycle de Krebs

Le cycle de Krebs est un ensemble de réactions enzymatiques entraînant la décarboxylation des différents métabolites participant à son anaplérose (Figure 12). Deux types de métabolites majeurs participent à l'anaplérose du cycle de Krebs : l'acétyl-CoA (issue de la glycolyse ou de la bêta-oxydation) ou le glutamate.

Par l'intermédiaire de la citrate synthase (CS), l'acétyl-CoA réagit avec l'oxaloacétate pour donner du citrate. Le citrate est ensuite transformé au cours de deux réactions enzymatiques médiées par l'aconitase en cis-aconitate à la suite d'une déshydratation, puis en isocitrate à la suite d'une réhydratation. L'isocitrate subit ensuite une décarboxylation médiée par l'isocitrate déshydrogénase (IDH) et est transformé en α -cétoglutarate, entraînant la régénération de nicotinamide adénine dinucléotide (NADH,H⁺) et la libération d'une molécule de dioxyde de carbone (CO₂). Comme décrit dans le chapitre 1.7.3.1.1, les mutations d'IDH ont un rôle majeur dans la leucémogénèse. C'est au niveau de l' α -cétoglutarate que le glutamate peut intégrer le cycle de Krebs. L' α -cétoglutarate est ensuite décarboxylé en succinyl-CoA par l' α -cétoglutarate déshydrogénase ce qui permettra la régénération de NADH et la libération d'une autre molécule de CO₂. Le succinyl-CoA est ensuite converti en succinate par la succinyl-CoA synthétase ce qui régénère une molécule de guanosine triphosphate (GTP). Le succinate est ensuite oxydé en fumarate par la succinate déshydrogénase qui fait partie du complexe II de la chaîne respiratoire. Cette réaction mène à la réduction de la flavine adénine nucléotide (FADH₂). Le fumarate est hydraté par la fumarate hydratase (FH) en malate. Il a été mis en évidence que la FH jouait un rôle clé dans l'hématopoïèse en participant au renouvellement des CSH. Par ailleurs il a également été montré que la FH était fortement exprimée dans les LAM et qu'elle favorisait la leucémogénèse. (167). La fermeture du cycle repose sur l'oxydation du malate en oxaloacétate par la malate déshydrogénase. Cette dernière réaction mène également à la régénération de NADH.

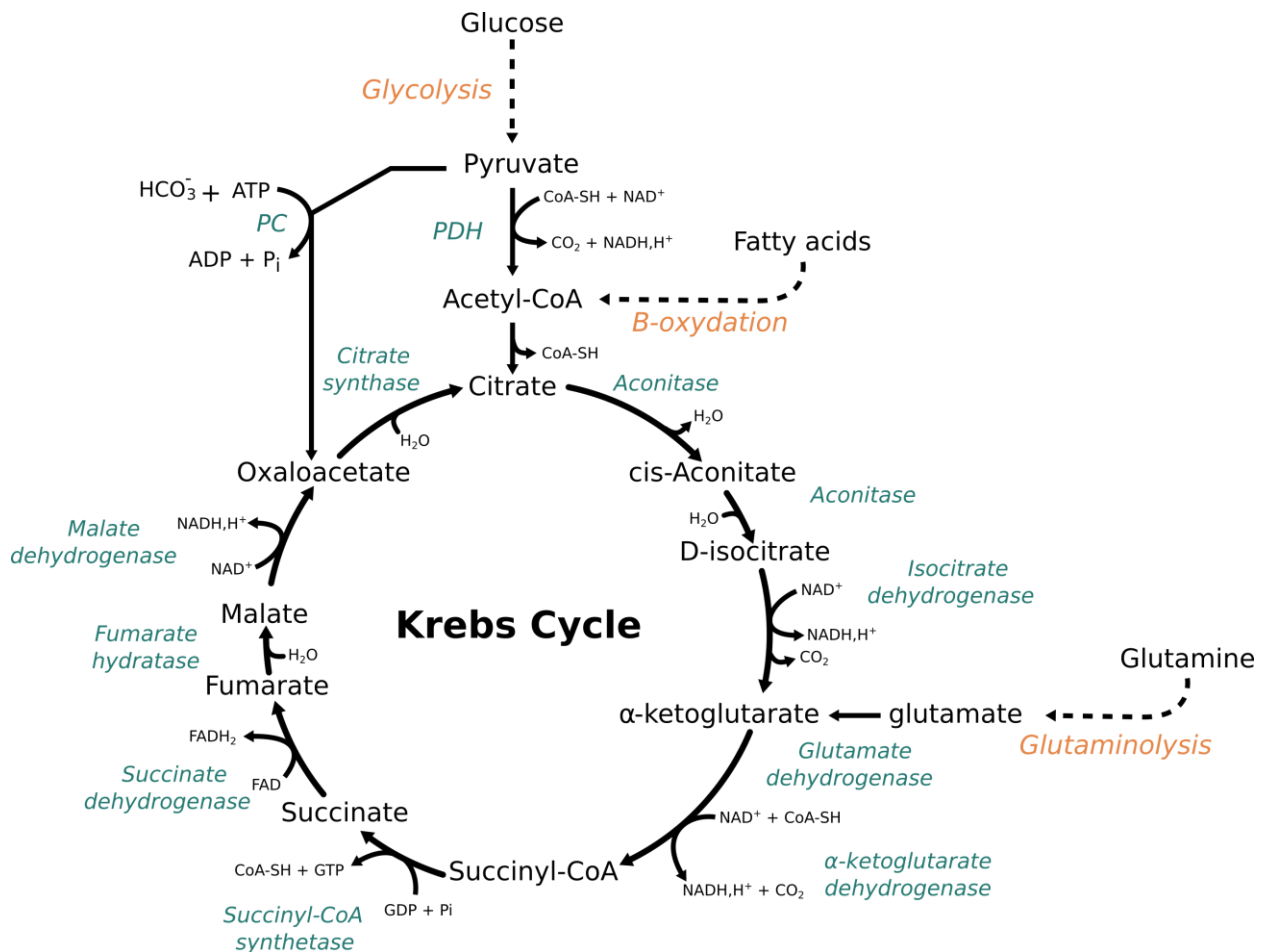


Figure 12. Schéma représentant les principales réactions du cycle de Krebs. PC : pyruvate carboxylase ; PDH : pyruvate déshydrogénase

2.3.2 La phosphorylation oxydative mitochondriale

2.3.2.1 Les complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire.

Le fonctionnement de la phosphorylation oxydative (OXPHOS) repose sur le couplage entre le transport d'électrons le long de la chaîne respiratoire, la sortie de protons et l'utilisation de ces protons par la FoF1 ATP-synthase afin de régénérer de l'ATP. Les électrons proviennent de l'oxydation de co-facteurs d'oxydo-réduction (NADH et succinate/FAD) par les complexes de la chaîne respiratoire. Grâce à l'énergie générée par le transport d'électrons, des protons sont expulsés depuis la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire mitochondrial dans le sens inverse du gradient ce qui constituera un gradient-électrochimique ($\Delta\psi_m$). Afin de régénérer de l'ATP, la FoF1 ATP-synthase utilise ce gradient-électrochimique en faisant rentrer des protons dans la matrice mitochondriale.

Les électrons cédés par ces molécules finiront, en bout de chaîne, par réagir avec de l'oxygène moléculaire ce qui correspond à la « consommation d'oxygène ». Ce processus de transfert d'électrons se déroule au sein de la chaîne respiratoire qui se compose de 4 complexes qui sont accompagnés par des ubiquinones et des cytochromes c. Comme le présente la Figure 13, les réactions d'oxydo-réductions de la chaîne respiratoire sont orientées grâce au potentiel redox E° de chaque couple redox. En effet, plus une molécule aura un potentiel redox faible, plus elle aura tendance à s'oxyder et à céder ses électrons. Par exemple le NADH a un potentiel redox $E^\circ = -0,32\text{mV}$. C'est donc un très bon réducteur.

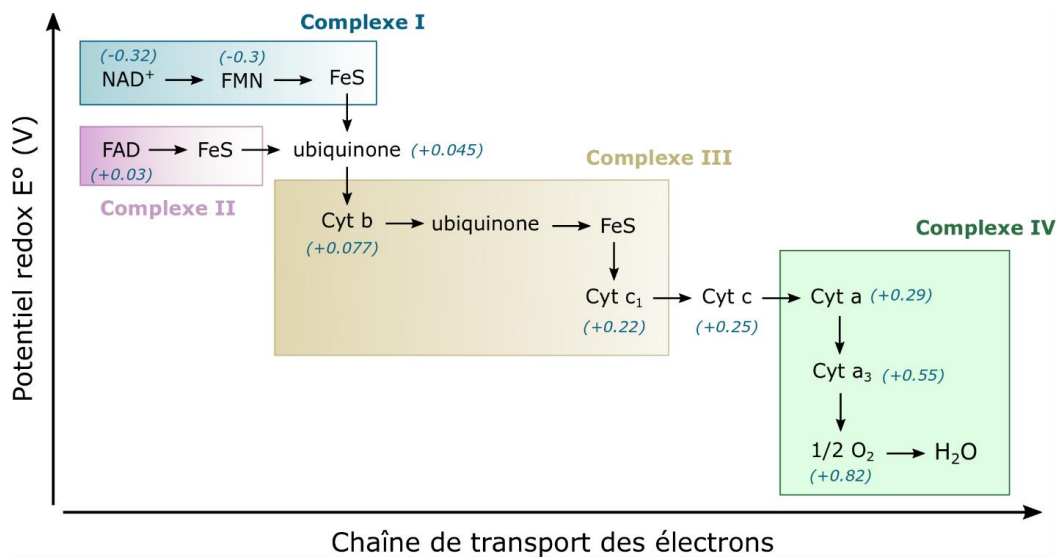


Figure 13. Schéma représentant les étapes du transport d'électron selon le potentiel redox. (→ : transfert d'électrons)

Au niveau clinique, l'évaluation de la contribution des complexes de la chaîne respiratoire à la consommation d'oxygène mitochondriale est particulièrement importante dans les démarches diagnostiques des mitochondriopathies (168). L'évaluation de l'activité des complexes constitue également une approche ayant démontré son intérêt dans différentes études pré-cliniques que ce soit par sa caractérisation qui a été réalisée dans différents cancers comme les cancers mammaires (169), les leucémies myéloïdes chroniques (170) ou encore les LAM (171) ; ou par les arguments qui mènent à considérer les complexes de la chaîne respiratoire comme de nouvelles cibles pour les traitements anticancéreux (172). En effet le ciblage du complexe I par le mubritinib, un inhibiteur de ERBB2 (Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2), a montré une action antileucémique *in vitro* et *in vivo* grâce à un effet inhibiteur du complexe I dépendant de l'ubiquinone (173). Le ciblage du complexe II par différentes molécules telles que les analogues de la vitamine E ou encore le 3-bromopyruvate a également montré des résultats intéressants dans différents modèles *in vitro* (174).

2.3.2.1.1 Complexe I : NADH-ubiquinone oxydoréductase.

Le complexe I (NADH-ubiquinone oxydoréductase) est la première enzyme de la chaîne respiratoire. Il catalyse le transfert de deux électrons du NADH à l'ubiquinone, couplé à la translocation de quatre protons au travers de la membrane. Le complexe I est composé d'une partie hydrophobe intermembranaire et d'une partie hydrophile périphérique qui fait face à la matrice mitochondriale. Le transfert d'électrons du nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) à la quinone se produit dans le domaine hydrophile *via* un ensemble de complexes fer/soufre. La sortie des 4 protons s'effectue par la partie du complexe située dans la région membranaire. Différentes molécules permettent d'inhiber le complexe I : les analogues de l'amiloride, les dérivés biguanides (dont la metformine et la phenformine), le MPTP (1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine), la piericidine A et la roténone (175). La roténone est l'inhibiteur le plus couramment utilisé dans les analyses d'oxymétrie. Son mécanisme d'action passe par l'inhibition du transfert d'électrons des centres fer-soufre du complexe I vers l'ubiquinone en se liant au site de liaison de l'ubiquinone du complexe I (176).

2.3.2.1.2 Complexe II : Succinate déshydrogénase

Le complexe II (succinate déshydrogénase) fait à la fois partie de la chaîne respiratoire et du cycle de Krebs. Ce complexe est composé de 4 grandes sous-unités (SDHA, SDHB, SDHC, SDHD) et oxyde le succinate en fumarate en trois étapes qui requiert du FAD et deux clusters fer-soufre comme cofacteurs d'oxydo-réduction. Les électrons libérés par la conversion du succinate en fumarate sont transmis à l'ubiquinone (UbQ) liée à la partie membranaire de complexe II, provoquant sa réduction en UbQH₂. Bien que le complexe II accepte deux électrons du succinate il n'entraîne pas la sortie de proton dans l'espace intermembranaire mitochondrial (177). Le complexe II peut être inhibé à l'aide de molécules comme les analogues de la vitamine E (aussi connu sous la dénomination analogue de la vitamine E α -tocophérol). Ces analogues de la vitamine E interagissent avec le site de liaison de l'ubiquinone au complexe II ce qui provoquerait un stress oxydant suite à la perturbation du transport d'électrons. D'autres molécules ont également démontré des propriétés inhibitrices vis-à-vis du complexe II telles que le 3-bromopyruvate, le malonate qui inhibe la sous-unité SDHA (cf partie 2.3.1.1.2), le thényltrifluoroacétone, le troglitazone ou encore les atpenins qui inhibent le transfert d'électrons du succinate à l'ubiquinone (174).

2.3.2.1.3 Complexe III. : Ubiquinol cytochrome c oxydoréductase

Le complexe III (Ubiquinol cytochrome c oxydoréductase) catalyse le transfert de deux électrons de l'ubiquinone au cytochrome c. Cette étape est associée à la sortie de 4 protons grâce au recyclage des électrons dérivant de l'oxydation de l'ubiquinone par le site ubiquinone réductase de ce complexe ce qui permet le pompage des protons. En plus de son rôle dans la chaîne respiratoire, le complexe III est également impliqué dans la génération de ROS lors d'hypoxie (niveau d'oxygène inférieur à 5%). En effet le complexe III est capable de libérer des anions superoxydes dans l'espace intermembranaire mitochondrial qui pourront rejoindre le cytosol et stabiliser la protéine HIF-1 α (178). Le complexe III peut être inhibé par l'antimycine A qui se lie spécifiquement au site de réduction de la quinone (179) ou encore par le myxothiazol qui se lie au site d'oxydation de l'ubiquinol et bloque le transfert d'électrons (180).

2.3.2.1.4 Complexe IV : Cytochrome c oxydase.

L'étape finale et limitante de la chaîne respiratoire se déroule au sein du complexe IV qui tient le rôle de centre de régulation de l'O₂PHOS. Le complexe IV : ou Cytochrome c oxydase (COX) appartient à la superfamille des oxydases à hème-cuivre. Le site actif binucléaire de ce complexe enzymatique est composé d'un noyau hème de haut spin (hème a₃) associé à un ion cuivre (Cu_B). En plus de ce centre binucléaire, la cytochrome c oxydase possède un hème de bas spin (hème a) et un autre centre cuivre (Cu_A). Les électrons cédés par le cytochrome c entrent dans ce complexe protéique par le centre cuivre Cu_A puis sont transférés successivement à l'hème a puis au site actif binucléaire où s'effectue la liaison de l'oxygène et sa réduction en eau. Durant cette étape, 4 protons sont consommés et 4 autres sont transloqués de la matrice vers l'espace intermembranaire. L'activité du complexe IV est rétrocontrôlé par le rapport ATP/ADP. Si ce rapport est élevé dans la matrice mitochondriale, alors les demandes énergétiques cellulaires sont moindres et l'activité de la chaîne respiratoire est réduite à la suite de la fixation allostérique d'ATP sur la sous-unité COX IV-1. Réciproquement si la demande énergétique est élevée alors la phosphorylation du résidu 58 (S58) de cette même sous-unité par la protéine kinase A (PKA) inhibera la fixation d'ATP et favorisera l'activité de la chaîne respiratoire (181). En plus de cette inhibition physiologique, le complexe IV peut également être inhibé par différentes molécules telles que le cyanure de potassium qui se lie à l'hème a₃-Cu_B et empêche l'utilisation de l'oxygène (182); ou encore par le trioxyde d'arsenic (ATO) qui induit l'ouverture du pore de transition mitochondrial et mène à la libération du cytochrome c l'empêchant alors de transmettre les électrons qu'il

transporte au complexe IV (183). L'ATO est utilisé en clinique pour traiter la leucémie aiguë promyélocytaire en ciblant PML/RARA. En se liant au groupement thiol de PML/RARA l'ATO induit la sumoylation et l'ubiquitination de cette protéine ce qui favorise sa dégradation par le protéasome (184).

2.3.2.2 Réactions chimiques des complexes de la chaîne respiratoire

L'ensemble des réactions d'oxydo-réductions ayant lieu au sein de la chaîne respiratoire est résumé dans la Tableau 5.

Complexe enzymatique	Réaction
Complexe I : NADH-ubiquinone oxydoréductase	$\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{Q} + 4\text{H}^+_{(\text{mat})} \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{QH}_2 + 4\text{H}^+_{(\text{eim})}$
Complexe II : Succinate déshydrogénase	$\text{Succinate} + \text{Q} \rightarrow \text{Fumarate} + \text{QH}_2$
Complexe III : Ubiquinol cytochrome c oxydoréductase	$\text{QH}_2 + 2 \text{Cyt } \text{c}^{3+} + 2\text{H}^+_{(\text{mat})} \rightarrow \text{Q} + 2 \text{Cyt } \text{c}^{2+} + 4\text{H}^+_{(\text{eim})}$
Complexe IV : Cytochrome c oxydase	$\text{O}_2 + 4 \text{Cyt } \text{c}^{2+} + 8\text{H}^+_{(\text{mat})} \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + 4 \text{Cyt } \text{c}^{3+} + 4\text{H}^+_{(\text{eim})}$

Tableau 5. Réactions des complexes de la chaîne respiratoire. Q : ubiquinone ; QH₂ : ubiquinol ; Cyt c : Cytochrome C ; (mat) : matrice mitochondriale ; (eim) espace intermembranaire mitochondrial

2.3.3 La FoF1 ATP synthase

2.3.3.1 Fonctionnement de la FoF1 ATP synthase

Les protons expulsés depuis la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire par les complexes I, III et IV de la chaîne respiratoire permettent la constitution d'une différence de potentiel électrique transmembranaire ($\Delta\psi$) et de pH (ΔpH). Ces deux composantes constituent le gradient électrochimique et génèrent une force proton-motrice. L'énergie stockée dans cette force proton-motrice est utilisée par la FoF1 ATP-synthase pour régénérer de l'ATP. Cette utilisation des protons par la FoF1 ATP-synthase constitue le couplage énergétique entre l'activité de la chaîne respiratoire et l'activité de la FoF1 ATP-synthase. Comme le montre la Figure 14, la FoF1 ATP-synthase est un complexe protéique composé de deux domaines enzymatiques distincts. Le domaine (Fo) est le domaine par lequel le flux de protons passe de l'espace intermembranaire mitochondrial pour rejoindre la matrice

mitochondriale. Ce passage de protons induit un changement de conformation du domaine (F1) et fournit l'énergie nécessaire à la régénération d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (185).

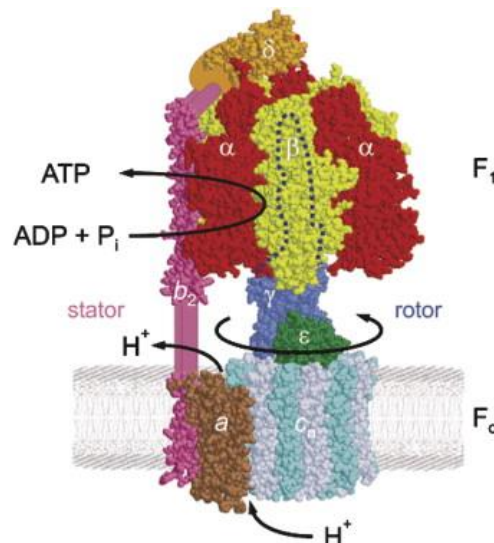


Figure 14. Modèle structural de la FoF1 ATP-synthase (186).

En cas d'altération du gradient de protons ou lors d'évènements ischémiques, la FoF1 ATP-synthase peut hydrolyser de l'ATP pour pomper des protons depuis la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire mitochondrial (187). La principale molécule utilisée en tant qu'inhibiteur de l'activité de la FoF1 ATP-synthase est l'oligomycine A. Cet inhibiteur se fixe à l'entrée du canal de proton de la partie Fo, empêchant l'entrée de proton. La liaison de l'oligomycine à la partie Fo induit également un changement de conformation de la partie F1 qui bloque la synthèse d'ATP (188).

Dans une cohorte de 200 patients atteints de LAM, il a été montré que 8% des sujets présentaient des mutations de l'ADN mitochondrial codant pour des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire (complexe I/III/IV et ATP synthase). La présence de ces mutations sont plus fréquentes chez les patients âgés et est associée à une survie globale plus courte (189).

2.4 Organisation des complexes de la chaîne respiratoire.

Grâce à différentes études, il a été mis en évidence que différentes associations fonctionnelles existaient entre les complexes de la chaîne respiratoire. Cette notion naît dans la publication de Schägger et Pfeiffer qui met en évidence l'association entre le complexe I, III et IV lors d'une migration en bleu d'électrophorèse en gel de polyacrylamide natif (BN-PAGE). Ils donneront le nom de respirasome à cette organisation supramoléculaire (190). A la suite de cette découverte, Acin-Perez *et al.* apportent quant à eux la preuve de l'activité fonctionnelle

des supercomplexes en mettant en évidence que des respirasomes isolés pouvaient transférer des électrons du NADH jusqu'à l'oxygène moléculaire (191). Cette organisation en supercomplexe est particulièrement retrouvée au niveau des crêtes mitochondriales où des observations par tomographie cryoélectronique ont permis de déterminer la localisation des différents éléments de la chaîne respiratoire. Comme le montre la Figure 15, les respirasomes occupent les pourtours de la crête mitochondriale tandis que les FoF1 ATP-synthase sont associées sous forme dimérique au niveau de l'apex de la crête. Cette disposition permettrait d'éviter les fuites de protons et aux FoF1 ATP-synthases d'exploiter le gradient de protons avec la plus grande efficacité optimisant ainsi les processus biochimiques de la phosphorylation oxydative (192–194).

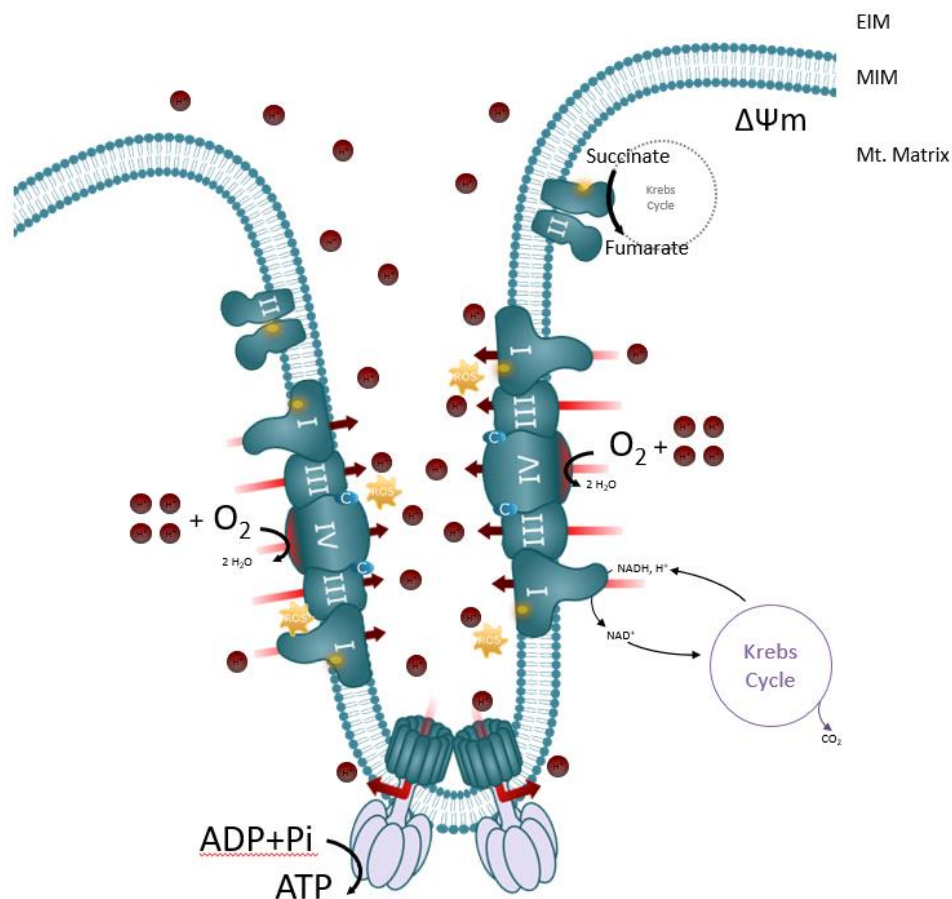


Figure 15. Organisation schématique des supercomplexes de la chaîne respiratoire. EIM : espace intermembranaire mitochondrial ; MIM : membrane mitochondriale interne ; Mt Matrix : matrice mitochondriale ; ROS : espèces réactives de l'oxygène.

Les complexes respiratoires sont donc capables de participer à la respiration cellulaire à la fois lorsqu'ils sont sous forme libre et lorsqu'ils sont superassemblés, constituant le modèle plastique. Ce modèle propose que les organisations fluides et en supercomplexes coexistent.

Cette vision inclusive énonce que l'organisation supramoléculaire des complexes de la chaîne respiratoire est dynamique et dépend de la localisation des complexes (194).

Il a été mis en évidence dans les LAM que la présence de supercomplexes était accrue et que cette organisation de la chaîne respiratoire était positivement corrélée avec l'expression de la neurolysinase (NLN) qui est une protéase impliquée dans la formation des supercomplexes. *In vitro* l'inhibition de cette protéase perturbe la formation de supercomplexes de la chaîne respiratoire et altère la phosphorylation. Ces effets permettent d'éradiquer sélectivement les LAM (CSL et non-CSL) (195).

2.5 Découplage du flux de protons entre la chaîne respiratoire et la FoF1 ATP-synthase

2.5.1 Découplage physiologique entre la chaîne respiratoire et la FoF1 ATP-synthase

Les protons expulsés par la chaîne respiratoire ne retournent pas dans la matrice mitochondriale que par le biais de la FoF1 ATP-synthase. En effet, il existe une perméabilité de la membrane mitochondriale interne pour les protons. Cette entrée de protons, indépendante du fonctionnement de la FoF1 ATP-synthase, est décrite comme la « proton leak ». Différentes protéines sont impliquées dans cette entrée de protons : les transporteurs d'anions mitochondriaux (comme le MPC), la protéine transporteuse de phosphate inorganique (SLC25A3), l'adénine nucléotide translocase (ANT) ou encore les protéines découplantes (UCP) (196). Il a été montré que les UCP2 et UCP3 pourraient agir comme des régulateurs du gradient de protons permettant de lutter contre le stress oxydant en détournant le flux de protons (188). Par ailleurs, il a été mis en évidence *in vitro* dans des conditions de co-cultures entre des cellules mésenchymateuses et des lignées cellulaires de LAM que ce type de culture induisait une diminution du potentiel de membrane mitochondrial qui était dépendante de l'expression d'UCP2 et qui favorisait l'activité glycolytique des cellules leucémiques (189).

2.5.2 Découplage expérimental entre la chaîne respiratoire et la FoF1 ATP-synthase

En plus de l'entrée physiologique de protons par les UCP, il est possible d'induire expérimentalement une entrée de protons dans la matrice en ayant recours à des molécules dites protonophores. Parmi ces molécules on retrouve notamment le 2,4-dinitrophénol (DNP), le carbonylcyanure m-chlorophénylhydrazone (CCCP), le carbonyl cyanide-p-trifluorométhoxyphénylhydrazone (FCCP) ou encore le BAM15 (191). Dans le cadre de cette thèse nous avons choisi d'utiliser le FCCP, qui est à l'heure actuelle l'un des protonophores les plus utilisés. Cet acide faible liposoluble augmente la perméabilité aux protons de la bicouche lipidique mitochondriale en facilitant le transport de protons à travers la membrane mitochondriale interne (MMI). Du côté de l'espace intermembranaire, le FCCP sous sa forme anionique (FCCP⁻) est réduit (FCCP-H) en réagissant avec un proton. À la suite de cette réduction il va librement traverser la bicouche lipidique de la MMI. L'environnement réducteur de la matrice mitochondriale engendrera son oxydation permettant ainsi la libération du proton transporté. De retour à sa forme anionique, le FCCP sous l'influence du potentiel électrochimique retourne vers le feuillet externe de la MMI. Le FCCP subira cette boucle d'oxydo-réduction pendant plusieurs minutes permettant ainsi une mesure stable de la consommation d'oxygène. L'intérêt de l'utilisation expérimentale de molécules protonophores réside dans le fait que l'entrée de protons dans la matrice mitochondriale va forcer la chaîne respiratoire à augmenter son activité. Puisque les effets protonophores dépendent de la concentration, il est ainsi possible de déterminer la consommation d'oxygène maximale atteignable par la chaîne respiratoire en saturant l'activité de cette dernière.

Ainsi en distinguant l'activité basale de la chaîne respiratoire de son activité maximale il est possible de déterminer la capacité de réserve respiratoire (ou SRC pour *spare reserve capacity*) qui correspond à la capacité cellulaire de répondre à un stress énergétique *via* son métabolisme énergétique mitochondrial (197).

2.6 Mesure de la consommation d'oxygène mitochondriale comme marqueur de l'activité de la phosphorylation oxydative dans les LAM

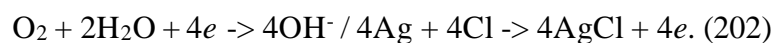
L'étude du métabolisme énergétique mitochondrial peut passer soit par l'analyse des différents paramètres fonctionnels mitochondriaux : masse mitochondriale (198), potentiel de membrane mitochondriale ($\Delta\Psi_m$) (199), métabolomique (170), mesure de l'ATP (200), niveau de stress oxydant (15), activité enzymatique des complexes de la chaîne respiratoire (171), consommation d'oxygène (168) soit par l'analyse de signatures géniques (105,201). Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes focalisés sur la mesure de la consommation en oxygène des mitochondries, qui en présence d'inhibiteurs spécifiques, permet d'évaluer l'activité de la phosphorylation oxydative mitochondriale (OXPHOS).

2.6.1 Les technologies d'évaluation de la consommation d'oxygène mitochondriale

Les technologies de mesure de la phosphorylation oxydative mitochondriale se sont grandement améliorées durant ces dernières années. Basées sur la mesure de la quantité d'oxygène dissous dans le milieu extracellulaire, deux approches sont principalement utilisées : la mesure polarographique à l'aide d'une électrode de Clark (ex : Oroboros O₂k) et la mesure par fluorimétrie (ex : Seahorse XFe24).

2.6.1.1 *Electrode de Clark*

La polarographie est une méthode de détection électrochimique permettant de déterminer la quantité d'oxygène dissous grâce à la mesure de la courbe courant-potentiel d'électrodes polarisées au cours d'une électrolyse. La sonde de l'électrode de Clark est composée d'une électrode de travail et d'une électrode auxiliaire reliée entre-elles afin de former une boucle de courant, d'une membrane perméable à l'air et d'une solution électrolytique composée de chlorure de potassium. Lorsqu'une tension est appliquée entre les électrodes de travail et auxiliaire, les molécules d'oxygène sont réduites au niveau de l'électrode de travail ce qui induit la diffusion de molécules d'oxygène au travers la membrane perméable à l'air, formant ainsi un courant de diffusion. Le processus de réaction spécifique des électrodes de travail et auxiliaire est exprimé par les équations chimiques suivantes :



Les électrons nécessaires à la réduction de l'oxygène sont libérés par l'électrode de platine, tandis qu'une contre réaction fournissant des électrons se produit à la surface d'une seconde électrode. Dans ce circuit fermé, les charges circulent sous forme d'électrons dans les métaux ou d'ions dans la solution électrolytique. La présence d'un ampèremètre dans le circuit permet de mesurer un courant dont la valeur est directement proportionnelle à la quantité d'espèces réagissant à la surface de l'électrode de platine, correspondant à la concentration d'oxygène dissous.

2.6.1.2 Fluorimétrie

La détection par fluorimétrie de la concentration d'oxygène repose sur l'utilisation de molécules sensibles à l'oxygène dont la fluorescence sera détectée par un capteur optique. Les différentes classes de sondes sensibles à l'oxygène utilisées sont abordées au sein de l'article publié par Wei, Yaoguang, *et al.* (Sensors 2019) (202). La fluorescence de ces molécules est liée à la concentration d'oxygène dissous. Ainsi en absence d'oxygène la fluorescence est maximale tandis qu'en présence d'oxygène l'émission photonique des sondes fluorescentes diminue, il s'agit du phénomène de « *quenching* ». Le *quenching* est une diminution de l'intensité de la luminescence causée par la formation de complexes non fluorescents à la suite d'interactions entre la molécule fluorophore et des molécules d'oxygènes. Afin de pouvoir mesurer une variation de fluorescence il est nécessaire d'exciter les sondes à l'aide d'une excitation lumineuse.

La technologie de fluorimétrie que nous avons choisie d'utiliser dans cette thèse est celle du Seahorse XFe Analyzer (XFe24 et XFe96). Ces fluorimètres permettent l'utilisation de microplaques de 24 ou 96 puits spécialement conçues pour la mesure simultanée de la variation de la quantité d'oxygène dissous et de la variation de l'acidité du milieu extracellulaire. Les microplaques Seahorse sont composées de deux parties : la première est la « cartouche » qui porte les sondes fluorescentes sensibles à l'oxygène et au pH et présente 4 pores d'injections ; la seconde est la « plaque cellulaire » dans laquelle seront déposées les cellules. Une fibre optique descend dans la cartouche et permet l'excitation des sondes à une longueur d'onde de 532nm ainsi que la détection de l'émission de fluorescence à une longueur d'onde de 650nm. Afin de permettre la mesure de la quantité d'oxygène dissous dans le milieu extracellulaire, la cartouche s'insère dans les puits de la plaque cellulaire et crée une micro-chambre hermétique comme le montre la Figure 16. Cette micro-chambre ne contient qu'un micro-volume (7 μ L pour le XFe24 et 2 μ L pour le XFe96) du milieu extracellulaire à proximité immédiate du tapis cellulaire (203).

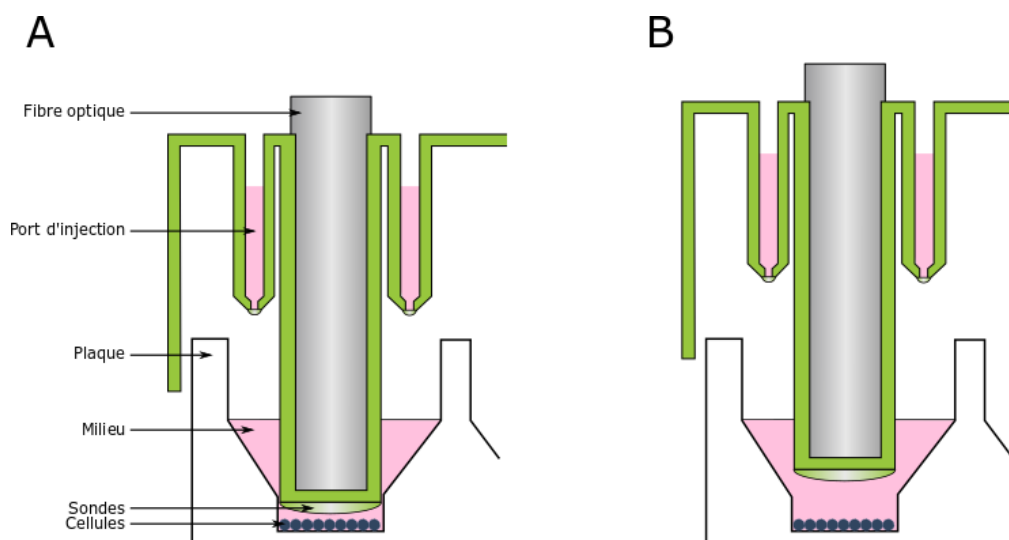


Figure 16. Schéma représentant la formation de la micro-chambre à l'intérieur du Seahorse. A - En position basse le Seahorse crée une micro-chambre. Dans ces conditions le milieu où se trouvent les cellules au fond du puits n'est plus en contact avec l'air ambiant. La formation de cette micro-chambre hermétique permet ainsi la mesure de la consommation d'oxygène. B - En position haute le piston relève la fibre optique et le Seahorse n'effectue pas de mesure de la consommation d'oxygène. Durant cette phase les échanges gazeux permettent de réoxygéner le milieu à proximité des cellules.

2.6.2 Etat de l'art de la mesure de la consommation d'oxygène mitochondriale dans les LAM

Dans la littérature, différentes caractéristiques du métabolisme énergétique mitochondrial des LAM ont déjà été identifiées. Farge *et al.* (Cancer discovery, 2017) ont démontré que les blastes résiduels après traitement par la cytarabine présentaient une oxydation accrue des acides gras soutenant la consommation d'oxygène mitochondriale (90). Sriskanthadevan *et al.* (Blood, 2015) ont quant à eux démontré que les blastes de patients atteints de LAM ont un métabolisme énergétique mitochondrial caractérisé par une faible capacité de réserve respiratoire (SRC). Cette caractéristique est associée à une sensibilité plus importante aux agents pro-oxydants agissant au niveau mitochondrial (171). Enfin Nelson *et al.* (Elife, 2021) ont mis en évidence que malgré le fait que les blastes leucémiques ont près de 2 fois plus de mitochondries que les CSH, les cellules leucémiques présentent une limitation intrinsèque de la synthèse d'ATP par le biais de l'OXPHOS. Ils ont également montré que la restauration de la phosphorylation oxydative entraînait un effet cytotoxique sur les blastes leucémiques, suggérant que la répression active de l'OXPHOS favoriserait les formes agressives de LAM (204).

Ces travaux démontrent ainsi l'intérêt de l'étude de la consommation d'oxygène mitochondriale dans la stratégie de prise en charge thérapeutique des LAM.

Problématique

Aujourd'hui encore la survie des patients de LAM reste faible, et ce particulièrement pour les sujets âgés et les patients ne pouvant bénéficier d'une chimiothérapie. Il est donc essentiel de déterminer de nouveaux biomarqueurs qui permettront de déterminer avec une plus grande précision quels traitements ou associations médicamenteuses seraient capables d'améliorer le pronostic vital des patients. Le suivi des LAM repose sur l'évaluation de critères cytogénétiques et moléculaires qui conduisent à la classification des patients en groupes pronostiques identifiés selon les recommandations de l'ELN. Cependant cette classification présente des limites. Pour améliorer sa prédictivité, des biomarqueurs phénotypiques fonctionnels comme le métabolisme énergétique des blastes pourraient être évalués. Dans le cadre de cette thèse, nous avons donc abordé cette problématique en évaluant le métabolisme énergétique des blastes en mesurant leur consommation d'oxygène mitochondriale.

Nous avons tout d'abord développé un protocole fiable, reproductible et simple pour mesurer les différents états de la consommation d'oxygène de blastes issus de patients atteints de LAM (Partie I). Ce type d'analyse repose sur l'obtention de matériel biologique "vivant" prélevé chez le patient et conservé à "court" ou à "long" terme avant l'analyse. Après avoir développé un protocole spécifiquement adapté à ce type cellulaire, nous avons comparé comment la mise en culture ou la cryoconservation pouvait influencer le métabolisme oxydatif mitochondrial.

Puis, à partir de prélèvements de 58 patients atteints de LAM obtenus entre novembre 2018 et mars 2021, nous avons évalué les différents états de la consommation d'oxygène (couplée ou non à la synthèse d'ATP), nous avons aussi déterminé leur capacité à répondre à un stress énergétique mimé par des agents découplants (évalué à partir de la mesure de la capacité de réserve respiratoire). A partir de ces analyses, nous avons évalué si les blastes des différents patients présentaient tous un métabolisme oxydatif similaire ou si des différences existaient. Si des différences existent, alors nous déterminerons si elles peuvent être corrélées avec la survie des patients.

Enfin nous avons recherché quels substrats carbonés étaient oxydés et quelles voies métaboliques étaient sollicitées durant la consommation d'oxygène mitochondriale des blastes de patients dans un état dit "basal", mais aussi dans des conditions nécessitant de répondre à une demande soudaine en énergie nécessitant l'accélération de la chaîne respiratoire (capacité de réserve respiratoire).

Résultats

Partie I: Clinically relevant oxygraphic assay to assess mitochondrial energy metabolism in acute myeloid leukemia patients

(Article actuellement soumis au journal "Cancers")

Résumé :

Le métabolisme énergétique mitochondrial participe activement à la résistance des LAM face à la plupart des thérapies actuellement utilisées en clinique. Afin de déterminer si ce métabolisme énergétique pourrait être une source de biomarqueur potentiel, il est nécessaire d'établir les conditions de culture et de conservations cellulaires adaptées à la mesure de la consommation d'oxygène des blastes issus de patients atteints de LAM.

Dans la première partie de cette thèse nous avons donc cherché à répondre aux questions suivantes :

- Quelle est la quantité minimale de cellules nécessaires pour évaluer la consommation d'oxygène à partir de sang ou de moelle de patients atteints de LAM ?
- Quelles sont les inhibiteurs / agents découplants et à quelle concentration doivent-ils être utilisés pour mesurer la consommation d'oxygène dépendante ou non de la synthèse d'ATP, l'activité maximale de la chaîne respiratoire et la capacité de réserve respiratoire et la consommation d'oxygène non mitochondriale ?
- Peut-on maintenir les blastes en culture après le prélèvement sans induire d'altérations du métabolisme mitochondrial ?
- Est-il possible de mesurer de manière fiable la phosphorylation oxydative des blastes après cryopréservation et décongélation, suivie de la mise en culture ?

Toutes les étapes de l'évaluation de la consommation d'oxygène dans les blastes de LAM ont été décrites : du prélèvement sanguin jusqu'à l'évaluation de la consommation d'oxygène. Le nombre de cellules nécessaires pour effectuer une mesure de la consommation d'oxygène a été évalué. Les conditions de culture qui soutiennent le métabolisme énergétique ont été testées. Les analyses ont été réalisées à partir d'échantillons de sang frais (ou de moelle osseuse), de blastes cultivés pendant 18 heures dans un milieu RPMI complet supplémenté en cytokines ou de blastes décongelés obtenus après cryoconservation. Les concentrations d'inhibiteurs et les temps d'incubation pour mesurer la consommation basale d'oxygène, la

fuite de protons, le renouvellement de l'ATP, la consommation maximale d'oxygène, la capacité de réserve respiratoire (SRC) et la respiration non-mitochondriale ont été évalués.

Nous avons ainsi pu montrer que $2,5 \times 10^6$ blastes (avec un XFe24) ou $0,9 \times 10^5$ blastes (avec un XFe96) étaient suffisants pour mesurer les différents paramètres reliés à la consommation d'oxygène. Nous avons également mis en évidence que la capacité de réserve respiratoire (SRC) des blastes ne pouvait être mesurée correctement qu'en utilisant systématiquement une gamme de concentration de FCCP. Enfin, nous avons démontré que la mesure de la consommation d'oxygène des blastes pouvait être réalisée dans les 3 heures suivant la prise de sang ou dans les 18 heures si les blastes sont maintenus en milieu RPMI complet supplémenté en cytokines. Cette supplémentation en cytokines est également nécessaire pour mesurer la consommation d'oxygène à partir d'échantillons cryoconservés.

En conclusion ces différents résultats nous ont permis de définir un protocole standardisé pouvant être utilisé dans de futures études pour évaluer la consommation d'oxygène en tant que biomarqueur fonctionnel.

Clinically relevant oxygraphic assay to assess mitochondrial energy metabolism in acute myeloid leukemia patients

Quentin Fovez¹, William Laine¹, Laure Goursaud^{1,2}, Celine Berthon², Nicolas Germain^{1,4}, Claire Degand¹, Jean-Emanuel Sarry², Bruno Quesnel^{1,2}, Philippe Marchetti^{1,4} and Jerome Kluza^{1*}.

¹ Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille, UMR9020 – UMR-S 1277 - Canther – Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France; e-mail@e-mail.com

² Hematology Department, CHU of Lille, Lille, France

³ Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, Université de Toulouse, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, Toulouse, France, France

⁴ Centre de Bio-Pathologie, Banque de Tissus, CHU of Lille, Lille, France

* Correspondence: jerome.kluza@univ-lille.fr; Tel.: +33 320169220

Simple Summary: AML mitochondrial oxidative phosphorylation has recently been identified as a biological property that influences the response to antitumor therapy. In the present study, we propose a standardized protocol to measure mitochondrial metabolic organization in patient blasts (from the blood or bone marrow) using XFe24 or XFe96 Seahorse. Monitoring mitochondrial oxygen consumption of blasts could improve the prediction of drug response in AML patients, especially in clinical trials.

Abstract: Resistant acute myeloid leukemia (AML) exhibits mitochondrial energy metabolism changes compared to newly diagnosed AML. This phenotype is often observed by evaluating the mitochondrial oxygen consumption of blasts, but most of oximetry protocols were established from leukemia cell lines without validation on primary leukemia cells. Moreover, the cultures and storage conditions of blasts freshly extracted from patient blood or bone marrow cause stress, which must be evaluated before determining oxidative phosphorylation (OXPHOS). Herein, we evaluated different conditions to measure the oxygen consumption of blasts using extracellular flow analyzers. We first determined the minimum number of blasts required to measure OXPHOS. Next, we compared the OXPHOS of blasts cultured for 3 hr and 18 hr after collection and found that to maintain metabolic organization for 18 hr, cytokine supplementation is necessary. Cytokines are also needed when measuring OXPHOS in cryopreserved, thawed and recultured blasts. Next, the concentrations of respiratory chain inhibitors and uncoupler FCCP were established. We found that FCCP concentration required to reach the maximal respiration of blasts varied depending on the patient sample analyzed. These protocols provided can be used in future clinical studies to evaluate OXPHOS as a biomarker and assess the efficacy of treatments targeting mitochondria.

Keywords: energy metabolism, leukemia, resistance, functional biomarker, uncoupling respiration, OCR, XFe24 seahorse, XFe96 Seahorse.

Citation: Fovez, Q.; Laine, W.; Kluza, J. Clinically relevant oxygraphic assay to assess mitochondrial energy metabolism in acute myeloid leukemia patients. *Cancers* **2021**, *13*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname Last-name

Received: date
Accepted: date
Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) is a malignant myeloid disease characterized by the loss of blast differentiation and clonal amplification in the peripheral blood and bone marrow. Over the past decade, improvements in AML diagnosis and advances in therapeutic approaches have improved the outlook for patients. However, despite this considerable progress, the five-year overall survival rate for AML is still 24% [1]. To date, the diagnosis and management of hematologic malignancies are primarily based on the cytogenetic and molecular characteristics of leukemic blasts.

European LeukemiaNet (ELN-2017) recommendations have determined the profiles of coexisting and exclusive mutations in blasts to provide prognostic information and allow the classification of patients into 3 risk groups (patients with favorable, intermediate, or adverse risk) [2]. The ELN classification is used to guide postremission treatment; notably, hematopoietic allogeneic transplant does not seem necessary for patients in complete first remission, whereas this therapy is strongly recommended for patients with adverse risk [3]. However, further refinements of the ELN-2017 classification are still under investigation [4]. Therefore, the evaluation of new biomarkers is needed to complete the ELN classification, and blast energy metabolism could be a potential candidate [5].

AML metabolism, in particular, the energy functions of the mitochondria of leukemic blasts, have recently been identified as a biological property that influences the response to antitumor therapy. Pharmacological inhibitors of mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) (e.g., oligomycin [6], CB839 [7] and other drugs such as tigecycline [8]) increase the AML cell death in vitro and promote the eradication of leukemic stem cells. In other hematopoietic diseases, such as multiple myeloma, electron transport chain activity is also a predictor of venetoclax sensitivity [9]. Moreover, molecules targeting mitochondria (e.g., complex I inhibitors) are currently under preclinical investigation or in phase I clinical trials for the treatment of AML [10]. Since mitochondrial metabolic activity supports AML resistance, OXPHOS could be considered a potential biomarker to predict the response to treatment. However, robust and efficient clinical markers of OXPHOS in leukemic blasts are still under investigation.

In particular, methods for measuring mitochondrial oxygen consumption have been developed in recent years. Based on the quantification of O₂ dissolved in aqueous solution, polarographic oxygen sensors (Clark electrodes and others) have been widely used [11]. However, fluorometers that simultaneously assess OXPHOS and glycolytic activity (XFe24 and XFe96 Seahorse) are other alternatives to quantify the oxygen consumption of various cell models, including AML [12].

The oxygen consumption of patient blasts has been evaluated in several studies, but the different methodologies used (number of cells, concentration of inhibitors or culture conditions) do not allow comparison of the data obtained from different reports. In the present study, we propose a standardized protocol to measure mitochondrial metabolic organization in patient blasts using Seahorse XFe24 or XFe96. All tests were performed with blasts taken from the blood or bone marrow of patients with AML. The protocols were designed for clinical use at the time of AML diagnosis or relapse.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

Oligomycin A, carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP), antimycin A, rotenone, BAM15, and poly-L-lysine were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA). Stock solutions (10 mM or 2.5 mM) of each compound were prepared in sterile dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored at -20°C. All XFe24 and XFe96 plates were purchased from Agilent Technologies (Santan Clara, CA, USA).

2.2 Blast collection and cell culture conditions

AML samples (Table 1) were obtained from individuals recruited from the Department of Hematology (Lille CHU, France) with informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki and with the approval of the Institutional Ethical Committee (CPP Lille). Blood or bone marrow samples were diluted twofold with PBS and gently placed on top of Pancoll human ($d = 1.077 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (PAN-Biotech) by running the blood against the wall of the tube. Samples were then centrifuged for 30 min (400 g – Acc.1 Dec.1). Mononuclear cells were then collected and washed twice in PBS followed by centrifugation for 5 min (300 g – Acc.9 Dec.9). If needed, the red blood cells were lysed with osmotic buffer (0.1 M KHCO_3 , 1.55 M NH_4Cl and 0.037 g of Na_2EDTA). After isolation, the cell number and cell viability were assessed using a cell counter (Z2 Coulter Counter) and a viability test (LUNA-FL™ Dual Fluorescence Cell Counter) (trypan blue or propidium iodide).

Table 1. Patient characteristics including sex, age, the French-American-British (FAB) classification of AML and the European LeukemiaNet (ELN) risk classification (favorable, intermediate or adverse risk). s-AML: secondary AML.

Patient	Sex	Age	FAB	ELN	Cytogenetic karyotype
AML #1	F	88	M5a	3	47,XX,+6,+8,del(9)(q21),-12,+13,del(17)(p11)
AML #2	M	65	M2	N.D.	46,XY,t(3;3)(q21;q26.2),der(16)t(1;16)(q21;q24)
AML #3	F	75	M1	2	46,XX,add(9)(q3?)
AML #4	M	69	M0	3	46XY, Isochromosomy 11, del(17), t(17,21)
AML##5	M	78	M2	3	45,XY,t(3;3)(q21;q26),-7
AML#6	M	65	N.D	3	46,XY,del(7)(q12q36)/47,XY,+21/46,XY
AML#7	M	70	M1	2	46,XY
AML#8	M	50	M1	2	46,XY
AML#9	M	71	M5a	3	47,XY,t(1;14)(p32;q32),del(7)(q22q34),der(7)t(7;11)(q34;q22),+13
AML#10	F	49	N.D	N.D	N.D
AML#11	M	38	s-AML	N.A	N.D
AML#12	F	46	M2	1	46,XX,t(8;21)(q22;q22)/45,sl,-X,del(9)(q22)
AML#13	M	54	M1	1	46,XY
AML#14	F	67	M1	2	46,XX
AML#15	F	58	N.D	2	46,XX
AML#16	M	34	N.D	3	45,XY,-7,-12,+mar
AML#17	F	86	M4	3	44,X,-X,del(4)(q21),-8,add(9)(p24),add(11)(p15),-16,-17,-12,+19,-20,add(21)(p13),+mar
AML#18	F	67	N.D	2	46,XX,i(7)(p10)/46,XX
AML#18	F	67	N.D	2	46,XX,i(7)(p10)/46,XX
AML#19	M	69	M4	3	46,XY,t(7;21), RUNX1
AML#20	F	86	N.D	3	46,XX,-6,+8, del(7p) add17p
AML#21	M	30	N.D	N.D	N.D
AML#22	M	67	M3	1	46,XY,t(15;17)(q24;q21)/46,XY, PML-RAR α
AML#23	M	59	M4	2	46,XY, EVI1 overexpression
AML#24	F	90	N.D	N.D	46,XX
AML#25	M	72	M4	1	46,XY,inv(16)(p13q22)
AML#26	F	81	M4	2	46,XX
AML#27	F	63	M5a	3	48,XX,+8,t(9;11)(p22;q23),+ider(9)(p10).ish t(9;11)(3'KMT2A+;5'KMT2A+),ider(9)(3'KMT2Ax2), KMT2A-MLLT3, EVI1 overexpression

Mononuclear cells were frozen in cryopreservation medium (90% fetal bovine serum (Gibco) + 10% DMSO (Sigma)). Cryogenic tubes were placed in freezing containers containing isopropanol and stored at -80°C for 2-3 days. The cryogenic tubes were then placed in a nitrogen tank for long-term storage. Samples were thawed in RPMI medium (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), 50 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ penicillin, 50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ streptomycin and 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DNase I 1X (Sigma). Mononuclear cells were cultured at 37°C with 5% CO_2 in RPMI medium (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), 50 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ penicillin, 50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ streptomycin. RPMI medium has been optionally supplemented with cytokines cocktail (CTK) containing 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ interleukins (IL-3, IL-6, and IL-7), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), 50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ FMS-like tyrosine kinase 3 ligand (FLT3L), 5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and 25 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ stem cell factor (SCF) (PeproTech).

2.3 Oxygen consumption rate (OCR) measurements

OCRs were measured using a Seahorse XFe24 or XFe96 analyzer (Seahorse Bioscience, Billerica, MA, USA). Seahorse XFe24 and XFe96 microplates were pre-coated the day of the experiment for at least 15 min with 3 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ Corning™ Cell-Tak solution (Fisher Scientific): 35 μL (XFe24) or 20 μL (XFe96). Alternately, microplates can be coated with 35 μL (XFe24) or 20 μL (XFe96) of 0.1% poly-L-lysine (Sigma) one day prior to the experiment for at least 18 hr in a 37°C CO_2 -supplied incubator. After the coating process, the microplates were rinsed with sterile water. Cells were suspended in OXPPOS medium containing DMEM (D5030, Sigma-Aldrich) with L-glutamine (2 mM), glucose (10 mM) and pyruvate (1 mM) and seeded in XFe24 cell plates (100 $\mu\text{L}\cdot\text{well}^{-1}$) or XFe96 cell plates (50 $\mu\text{L}\cdot\text{well}^{-1}$). Cells were left to adhere by two successive centrifugations at low speed (160 g for 1 min), and each microplate was then left to stabilize for at least 20 min at 37°C in a CO_2 -free incubator. Next, 400 μL (XFe24) or 100 μL (XFe96) of warm OXPPOS medium was added to each well. Before each OCR measurement, calibration and equilibration of the Seahorse analyzers were performed. Each port was loaded with 75 μL (XFe24) or 20 μL (XFe96) of inhibitor diluted in OXPPOS medium. The OCR was assessed at baseline and after injection of each of the following molecules: oligomycin A, FCCP (or BAM15), rotenone and antimycin A. All settings are available in Table 2 and supplementary table 2.

Table 2. XFe24 Settings for mitochondrial OXPPOS measurement

Settings	Cycles	Mix	Wait	Measure	Total duration
Basal	3	2 min 20 s	2 min	2 min	19 min
Oligomycin	2	2 min 20 s	2 min	2 min	12 min 40 s
FCCP ₁	2	2 min 20 s	2 min	2 min	12 min 40 s
FCCP ₂	2	2 min 20 s	2 min	2 min	12 min 40 s
Antimycin A + Rotenone	3	2 min 20 s	2 min	2 min	19 min

2.4 High-content imaging

Imaging was carried out using a Cytation 1 Cell Imaging Multi-Mode Reader (BioTek, VT, USA). The environment was controlled at 37°C . Hoechst (35.5 μM final concentration) was imaged using a 365 nm LED in combination with an EX 377/50 EM 447/60 filter cube. Image analysis was performed using Gen5 software (BioTek).

2.5 Cytofluorometric analysis

Cell viability and mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{M}$) were assessed by Annexin V-APC (0.45 μg per sample, 10 min, room temperature (RT); BioLegend), SYTOX blue (1 μM , 10 min, RT; Thermo Fisher Scientific) and TMRM (100 nM, 30 min, 37°C ;

Thermo Fisher Scientific) staining. Fluorescence intensity following cellular staining were analyzed with a FACS LSR Fortessa X20 (Becton Dickinson).

2.6 Statistical analysis

All data are represented as the means \pm SD or \pm SEM. One-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's or Sidak post hoc test were used to compare mean values between multiple groups. Statistical analysis was performed using Prism version 6.0f (GraphPad Software, La Jolla, CA). P values < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Minimum number of blasts required to measure OXPHOS

To establish a standardized protocol to assess blast OXPHOS with Seahorse XFe24 or XFe96, all experiments were performed with blasts isolated from the blood or bone marrow of AML patients (Table 1). The blood of AML patients collected at the time of diagnosis usually contains a high number of blasts. Mononuclear cells were isolated from the patient's peripheral blood by density gradient centrifugation on a Pancoll Human, cultured in full RPMI medium and washed and resuspended in OXPHOS medium before oxygen consumption evaluation. Because leukemia cells are nonadherent, they should be immobilized at the bottom of the XFe24 or XFe96 Seahorse microplates. Therefore, Cell-Tak coated plates were prepared before analysis (see also the alternative protocol with poly-L-lysine in the Materials and methods section).

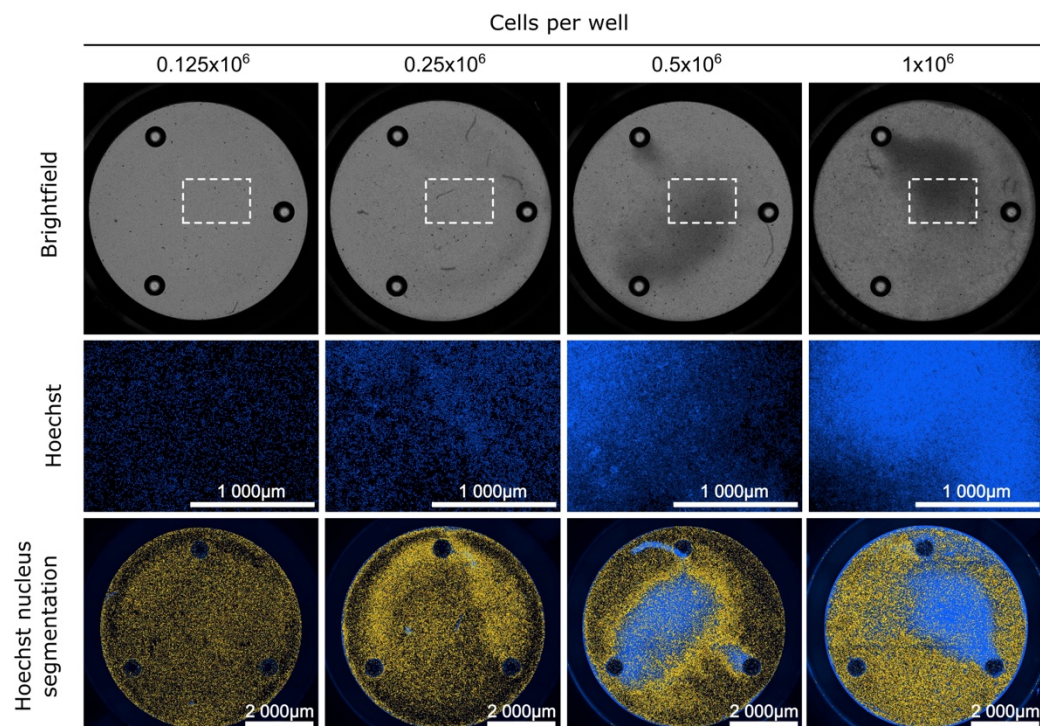
First, we determined the appropriate number of blasts to seed in each well (the area per well in XFe24 plates is 28.3 mm^2) to completely cover the wells without cell overlap. AML blasts were seeded at a density between 0.125×10^6 and 1×10^6 cells in XFe24 plates (Fig. 1A), and brightfield images were immediately taken from several representative wells (Fig. 1A, upper panel). The images showed cell overlay with 0.5×10^6 cells. To confirm these results, the blasts were stained with Hoechst, and the nuclei were visualized using a fluorescence cell imager (Cytation I) (Fig. 1A, middle panel). With 0.5×10^6 cells, the cell overlay increased the blue background fluorescence. Under these conditions, cell counting cannot be correctly performed with an automatic detection method based on nucleus segmentation (Cell Imaging®) (Fig. 1A, bottom panel). The same experiments were carried out in XFe96 Seahorse microplates (area of 11.4 mm^2 per well), and cell overlay was observed with 1.8×10^5 cells (Fig. S1A).

Next, real-time OCR measurements were taken by isolating a small volume ($7 \mu\text{L}$ from the XFe24 plates or $2 \mu\text{L}$ from the XFe96 plates) from a transient microchamber of medium above the blasts attached to the microplate wells. The consumption of cellular oxygen causes a rapid decrease in the dissolved oxygen concentration compared to wells containing only medium (background) (Fig. 1B and Fig. S1B). When the measurement was complete, the cartridge was lifted, which allowed a large volume of medium to restore the oxygen values in the medium surrounding the cells to the baseline. All parameters, including the number of microchamber open/close cycles, waiting time and measurement time, are summarized in Table 2 for the XFe24 Seahorse (and in Supplementary Table 1 for the XFe96 Seahorse). Using these parameters, a significant decrease in oxygen concentration was observed during chamber closure ($t_{0\text{min}}$, $t_{7\text{min}}$, $t_{14\text{min}}$) in the XFe24 plates with 0.125×10^6 cells, which became more pronounced with 0.25×10^6 cells. With the XFe96 Seahorse, a significant decrease in oxygen concentration was observed with 0.9×10^5 cells (Fig. S1B). In conclusion, to avoid blast overlay in the wells and detect significant variations in oxygen concentration during chamber closure, we decided to seed 0.25×10^6 cells in the XFe24 plate and 0.9×10^5 cells in the XFe96 plate for all the next experiments.

3. Sequential injections of inhibitors to measure OXPHOS.

The total amount of oxygen consumed by AML mitochondria represents only a partial picture of the OXPHOS process, so most protocols use sequential injections of inhibitors to measure the different states of mitochondrial oxygen consumption (Fig. 1C, Fig. S1C and Fig. S2A). During the first three measurements, the basal OCR of the blasts was determined (from $t_{0\text{min}}$ to $t_{15\text{min}}$). This result represents the sum of all of the oxidative processes consuming O_2 , such as the mitochondrial activity of cytochrome c oxidases (e.g., Cox IV) and other oxidase activities (e.g., NADPH oxidase activities, which are especially high in leukemic blasts [13]). After exposure to oligomycin A, the decrease in the OCR was related to the mitochondrial respiration used to generate ATP (from $t_{20\text{min}}$ to $t_{26\text{min}}$). The remaining respiration is composed of both proton leak and nonmitochondrial respiration and is linked to other oxygen-consuming processes independent of ATP production. The concentration of oligomycin A required to completely inhibit ATP synthase was determined using a range of concentrations, and ATP-linked blast respiration was found to be completely inhibited by $2 \mu\text{M}$ oligomycin A (Fig. S3A). Then, to estimate the maximum sustainable respiration by the blasts, protonophores such as FCCP (an uncoupler) were used (from $t_{32\text{min}}$ to $t_{51\text{min}}$) in two successive injections (Fig. 1C, Fig. S1C and Fig. S2). Following exposure to FCCP, oxygen consumption increased because the mitochondrial inner membrane became permeable to protons. The mitochondrial spare respiratory capacity (SRC) was then calculated by subtracting the FCCP-stimulated OCR (maximal OCR) from the basal OCR (Fig. S2B). The conditions to correctly reach maximal oxygen consumption will be discussed in the section below. Finally, protein complexes I and III of the respiratory chain were inhibited by a mixture of rotenone and antimycin A to determine the nonmitochondrial respiration of the blasts (from $t_{56\text{min}}$ to $t_{61\text{min}}$). The nonmitochondrial OCR was achieved after injection of a $1 \mu\text{M}$ antimycin A/rotenone mixture (Fig. S3B).

A



198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223

224

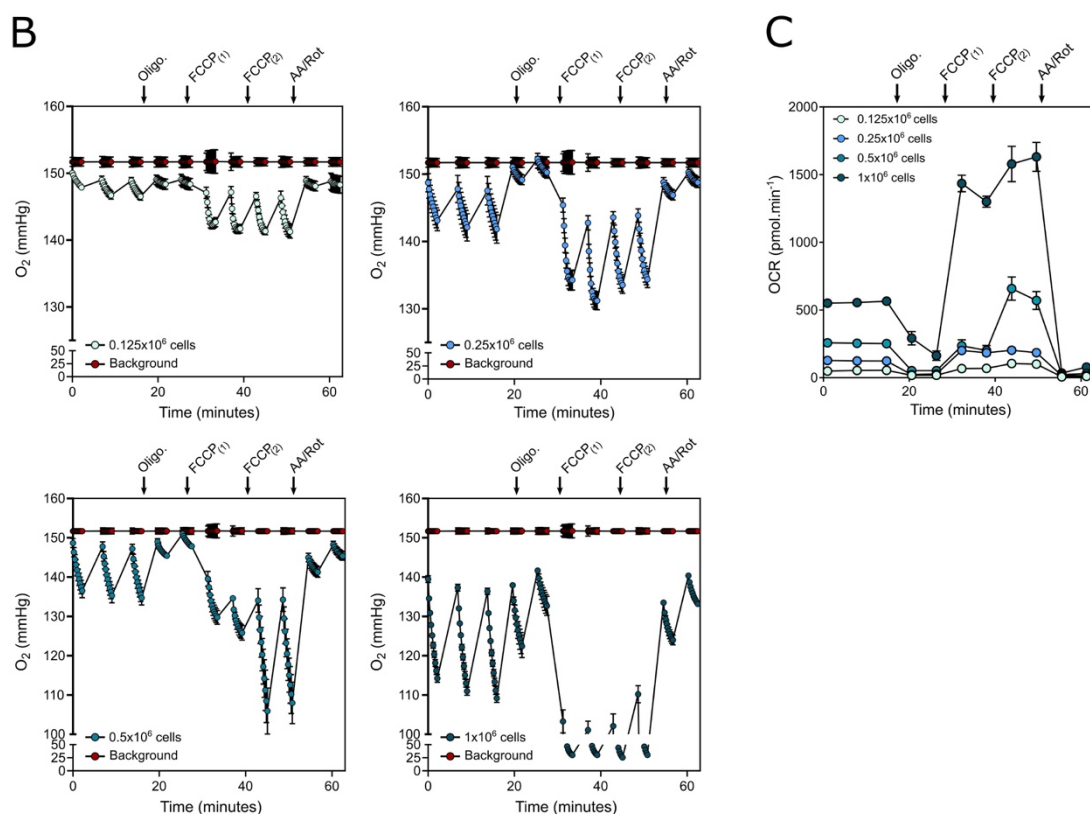


Figure 1. AML cell numbers required to measure oxygen consumption with the XFe24 Seahorse. (A) Top panel: Cellular imaging of AML blasts (0.125×10^6 to 1×10^6 cells). Images display the wells of XFe24 cell plates obtained by bright field light microscopy. Middle panel: Nuclei were stained using a Hoechst probe and visualized with a Cytation I fluorescence cell imager using a DAPI filter (scale bar = $1000 \mu\text{m}$). The dotted rectangles represent the selected area of each well. Lower panel: Images obtained after Hoechst staining analyzed using Gen 5 software; the segmentations of the nuclei are shown in yellow (scale bar = $2000 \mu\text{m}$). (B) Oxygen levels (mmHg) measured in the medium surrounding the AML blasts according to the number of cells per well. At the times indicated (see black arrows), the following drugs were injected: oligomycin A (Oligo; $2 \mu\text{M}$), FCCP1 ($1.1 \mu\text{M}$), FCCP2 ($2.2 \mu\text{M}$), and antimycin A and rotenone (AA/Rot; $1 \mu\text{M}$ each). Red dots represent the oxygen levels measured in the wells containing only medium (used for background correction). (C) Oxygen consumption rate (OCR; $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1}$) of blasts from AML patients according to the number of cells per well. Data are the means \pm SEM (at least $n = 3$ wells per group). All experiments were performed with blasts freshly collected from the blood of patient #16.

3.3 Optimization of FCCP concentrations required to reach the maximal OCR.

Maximal mitochondrial oxygen consumption is usually obtained by injection of an uncoupling agent (e.g., FCCP) after inhibiting ATP synthase by oligomycin A. Under these conditions, the transfer of electrons from the respiratory chain is uncoupled from the physiological proton gradient. However, Ruas *et al.* showed that the maximal respiration observed after FCCP treatment is underestimated in oligomycin-treated glioma and prostate cancer cells [14]. Thus, we first measured the maximal OCR from the blasts of 4 patients following exposure to FCCP preceded or not by treatment with oligomycin A (Fig. 2A). The maximal OCR was significantly higher in blasts treated with FCCP/oligomycin than in blasts treated with FCCP alone, suggesting that ATP synthase inhibition is required to obtain maximal respiration in AML blasts.

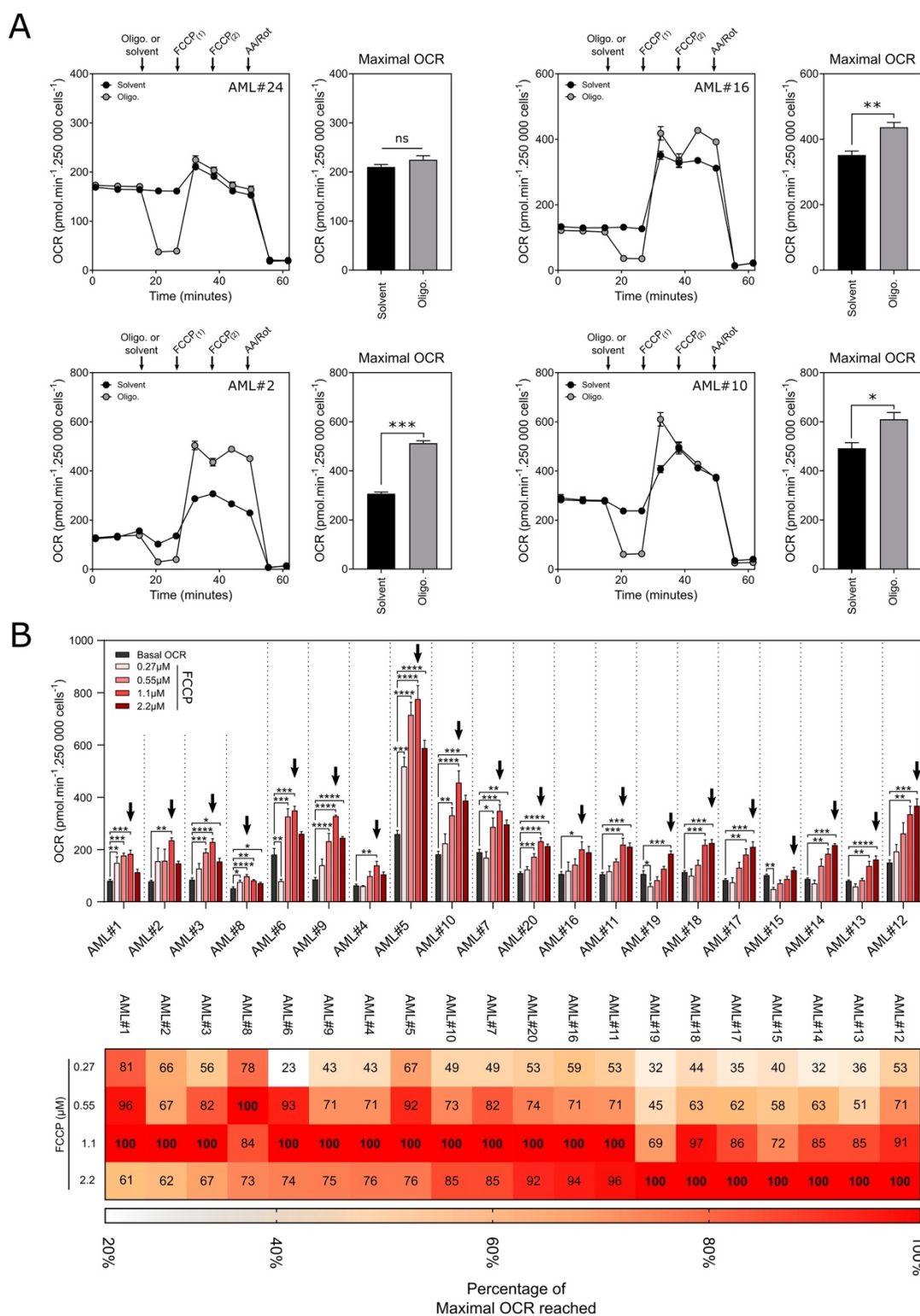


Figure 2. Range of FCCP concentrations required to achieve maximal oxygen consumption in AML blasts. (A) Oxygen consumption rate (OCR; $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 250,000\text{ cells}^{-1}$) of blasts from AML patients. After 20 min, 2 μM oligomycin (gray) or solvent (black) was injected as indicated, followed by exposure to FCCP1 (1.1 μM), FCCP2 (2.2 μM) and antimycin A and rotenone (AA/Rot; 1 μM each). Experiments were performed with the blasts from the patients indicated in the upper right corner of the OCR profile. The histograms represent the maximal OCR, which corresponds to the highest OCR value measured during FCCP treatment for each condition. (B) Top panel - Oxygen consumption rate (OCR; $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 250,000\text{ cells}^{-1}$) of the blasts from 20 AML patients according to the concentration of FCCP. Basal OCRs were measured before oligomycin A injection. Black arrows indicate the highest OCR value obtained after FCCP injection (maximal OCR). Data

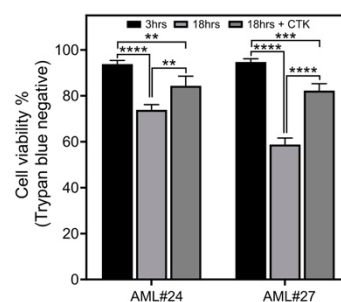
are the means \pm SEM (at least $n = 3$ wells per group). Statistical analyses were conducted with Dunnett's unidirectional ANOVA multiple comparison test (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$). Bottom panel - Heat map of the OCR values obtained according to FCCP concentration. Data are expressed as a percentage of the maximal OCR.

Next, the maximal OCR of the blasts from 20 different AML patients was achieved after injections of FCCP ranging in concentration from 0.27 to 2.2 μM using XFe24 Seahorse (Fig. 2B). The maximal OCR is identified with a black arrow in the upper panel of Fig. 2B. A representative OCR profile (with the blasts from patient #14) is shown in Fig. S4. After exposure to 0.27 μM FCCP, the OCR increased slightly in all samples. However, greater levels were observed in most samples exposed to higher concentrations of FCCP. The maximal OCR (the highest of the 2 OCR values after the addition of FCCP) was obtained with 0.55 μM FCCP for the blasts from patient #8, with 1.1 μM FCCP for the blasts from patients #1, #2, #3, #4, #5, #6, #7, #9, #10, #11, #16, and #20, and with 2.2 μM FCCP for the blasts from patients #12, #13, #14, #15, #17, #18, and #19. These data from 20 different patients showed that the FCCP concentration required to reach the maximal OCR varied depending on the sample analyzed. At the lowest concentrations, the maximum OCR may be underestimated. Conversely, for excessively high concentrations of FCCP, the OCR may collapse. This undesirable effect of high concentrations of FCCP is due to the excessive accumulation of this uncoupler in the inner mitochondrial membrane, leading to inhibition of the respiratory activity. Other uncouplers can also be used, such as BAM15 [15]. We successfully tested the BAM15 uncoupler on blast samples and found that BAM15 exhibited a profile similar to that of the FCCP-treated blasts (Fig. S5).

3.4 Cytokine supplementation is necessary to maintain mitochondrial metabolism during culture.

Next, we decided to analyze how culture conditions could modify the OCR profiles of blasts. Notably, steps following blood collection inevitably produce cellular stress, which can affect mitochondrial metabolic organization. Thus, the metabolic changes after blast isolation from two AML patients were evaluated by OCR measurements after being cultured under three different conditions: for 3 hr in full RPMI medium, for 18 hr in full RPMI medium, and for 18 hr in full RPMI medium supplemented with cytokines (Fig. 3) (see the composition and concentrations in the Materials and Methods section). The viabilities of the blasts as observed by trypan blue exclusion were greater than 90% after 3 hr in full RPMI medium but decreased considerably after 18 hr (Fig. 3A). However, supplementing the medium with cytokines allowed the blasts to maintain greater than 80% viability for 18 hr. Moreover, the OCR of the blasts incubated for 18 hr with cytokines did not show a significant change in the OCR profile compared to freshly isolated blasts (within 3 hr in full RPMI) (Fig. 3B). In contrast, blasts maintained for 18 hr in full RPMI (without cytokine supplementation) exhibited a great decrease in mitochondrial respiration, suggesting severe metabolic stress (Fig. 3B).

A



B

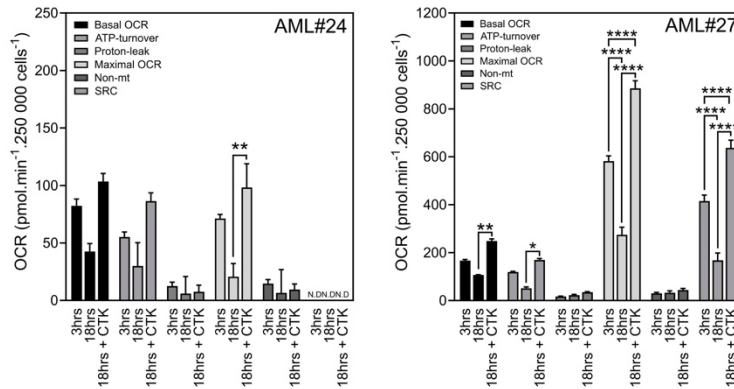
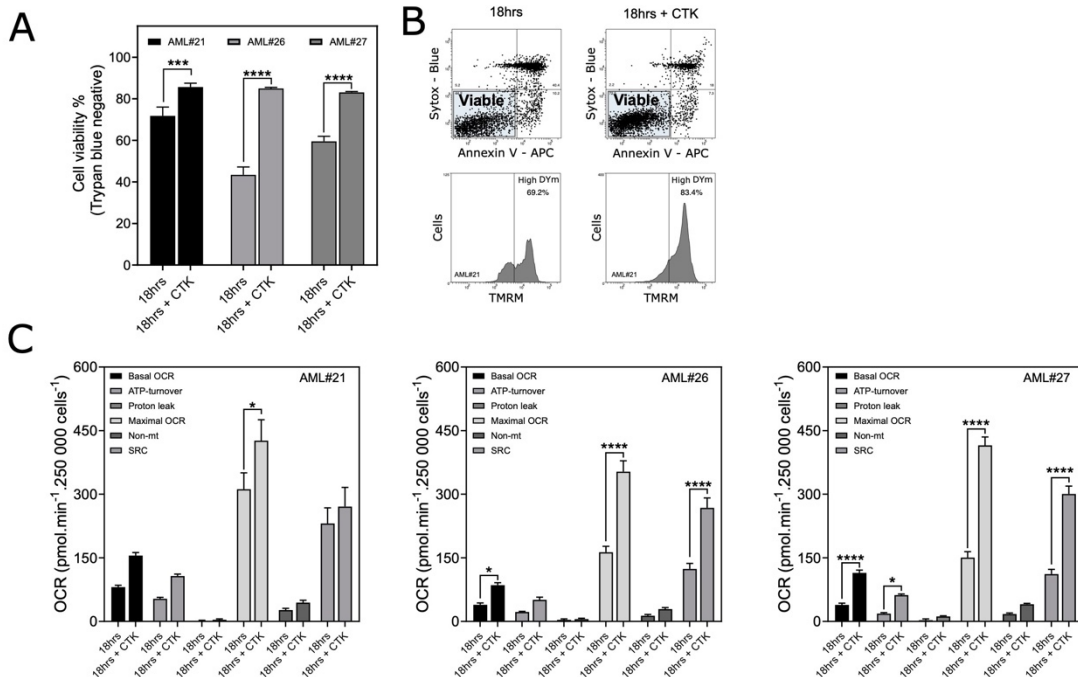


Figure 3. Assessment of the viabilities and OXPHOS parameters of blasts freshly collected from blood and cultured in RPMI medium. Cells were cultured in full RPMI medium for 3 hr/18 hr or in full RPMI medium supplemented with cytokines (CTK) for 18 hr (see the Materials and methods section for the composition and concentrations of cytokines). Experiments were performed with blasts from AML patients #24 and #27. (A) Cell viability was determined by trypan blue exclusion. Data are the means \pm SD (n = 3). (B) OXPHOS parameters of blasts cultured as indicated (basal OCR, ATP turnover, proton leak, maximal OCR, non-Mt (nonmitochondrial respiration) and SRC (spare reserve capacity)). Data are the means \pm SEM (at least n = 3 wells per group). *P<0.05; **P<0.01; ****P<0.0001.

Blast cryopreservation is a method used for the long-term storage of leukemia cells and is applied during most clinical trials to allow retrospective studies to be performed. Therefore, we evaluated the effect of cytokine supplementation on the survival and mitochondrial metabolic organization of thawed blasts after cryopreservation in liquid nitrogen. Blasts were cryopreserved for 45 days (patient #21) or 120 days (patients #26 and #27). Thawed blasts that were cultured for 18 hr in full RPMI supplemented with cytokines maintained their viability (> 80%) (Fig. 4A), preserved their mitochondrial inner membrane potential (for nonapoptotic blasts) (Fig. 4B and Fig. S6) and exhibited a higher OCR than thawed blasts cultured for 18 hr in full RPMI alone (Fig. 4C). These results confirm that cytokine supplementation sustains a high level of energy in blasts after cryopreservation.



294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313

Figure 4. Assessment of the viabilities and OXPHOS parameters of thawed AML blasts cultured for 18 hr after cryopreservation in liquid nitrogen. (A–C) Thawed blasts were cultured in full RPMI (for 18 hr) or in full RPMI supplemented with cytokines (18 hr + CTK). (A) Viability was determined by trypan blue exclusion. Data are the means \pm SD ($n = 3$). (B) Viable blasts were identified under both conditions by flow cytometry following Annexin V and SYTOX blue staining, and the percentages of blasts with a high mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$ M) values were determined by TMRM labeling (percentages are indicated in the top right corner of the cytometric profile). The experiment was conducted with blasts from patient #21. (C) OXPHOS parameters (basal OCR, ATP turnover, proton leak, maximal OCR, non-Mt (nonmitochondrial respiration) and SRC (spare reserve capacity)) of the thawed blasts cultured as indicated. Data are the means \pm SEM ($n = 3$). Experiments were performed with the blasts from the AML patients indicated in the upper right corner of the histograms.

3.5 Cryopreservation alters slightly mitochondrial metabolism of blasts

We also compared the OCR profiles of freshly collected blasts and thawed blasts after both were cultured for 18 hr in full RPMI supplemented with cytokines (Fig. 5A–F). In both groups, oximetry analysis showed that 3/5 samples were not statistically different with respect to their basal OCR, ATP turnover, proton leakage or nonmitochondrial OCR. For all 5 samples, the SRC was not different between the freshly collected blasts and corresponding thawed blasts, suggesting the robustness of this metabolic parameter. These results confirm that blasts can be stored for months and will retain a metabolic organization close to that of freshly isolated blasts.

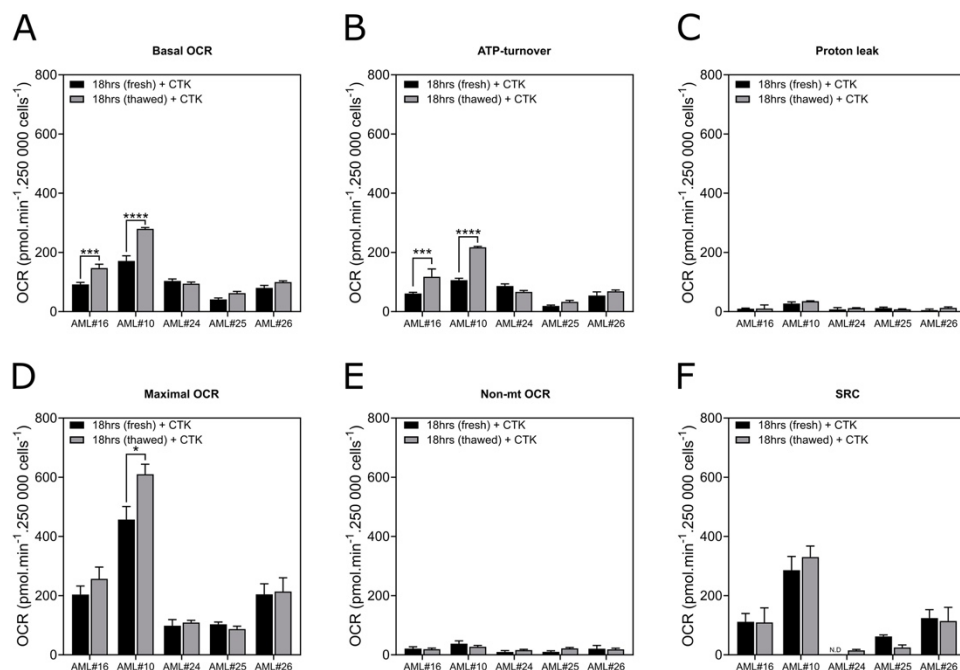


Figure 5. Assessment of the OXPHOS parameters of freshly collected blasts compared to their corresponding thawed blasts after cryopreservation. All samples were cultivated for 18 hr in full RPMI medium supplemented with cytokines. Experiments were performed with the blasts from the AML patients indicated in the histograms. Data are the means \pm SEM (at least $n = 3$ wells per group). * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

3.9 Assessment of OXPHOS in blasts from bone marrow.

Finally, we decided to apply our standardized oximetry protocol to measure the OCR from bone marrow blasts isolated from 5 different patients (Fig. 6). The determined OCRs confirmed that this protocol can be easily applied to both bone marrow and peripheral blood blasts. The bone marrow blasts showed slight differences in their basal OCR, maximal OCR and SRC when compared with the peripheral blood blasts from the same patient (Fig. 6A–F).

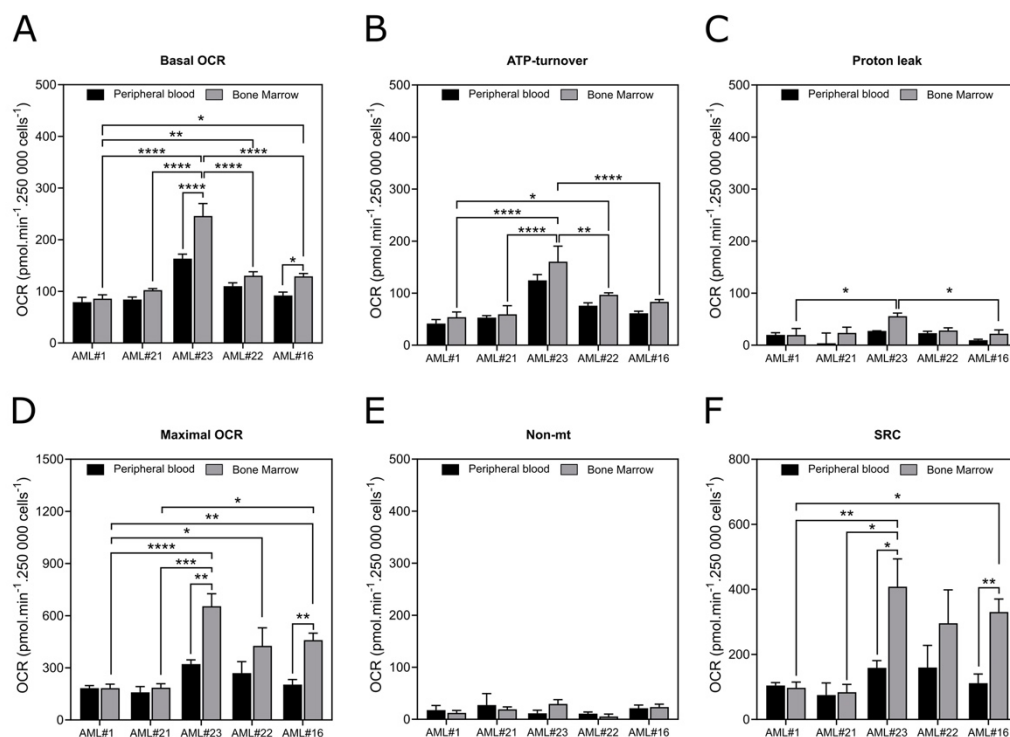


Figure 6. OXPHOS parameters of the blasts isolated from the bone marrow or peripheral blood of AML patients. (A-F) OXPHOS parameters were measured in freshly isolated blasts from peripheral blood or bone marrow from 5 AML patients. (A) Basal OCR, (B) ATP turnover, (C) proton leak, (D) maximal OCR, (E) non-Mt (nonmitochondrial respiration) and (F) SRC (spare reserve capacity). All samples were cultivated for 18 hr in full RPMI medium supplemented with cytokines. Data are the means \pm SEM (at least $n = 3$ wells per group). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

4. Discussion

To date, the study of OXPHOS represents a major interest to understand not only the mitochondrial dependency of AML cells ([10, 16–20] but also their adaptive nongenetic mechanisms of resistance to anticancer treatments such as intensive chemotherapy ([11, 21–22] or the newly approved targeted therapies IDHi and venetoclax ([23–28]. In this context, the assessment of a standardized, easy, fast, and robust protocol to measure mitochondrial oxygen consumption in blasts is an urgent need to define whether OXPHOS activity might be a functional biomarker that is predictive of drug response (as proposed in Bosc et al., in press ([28]) and support future clinical trials for AML management.

First, we established and validated a protocol achievable in 6 hr to assess mitochondrial respiration in blasts collected from the blood or bone marrow of 20 different AML patients. The parameters for OCR measurements with the XFe24 Seahorse and XFe96 Seahorse, the concentrations of inhibitors and the plates organization have been described in this study. Of note, our recommendation is to use 0.9×10^5 AML blasts per well for XFe96 or 0.25×10^6 blasts per well for XFe24. This analysis should be performed with blood or bone marrow at the time of diagnosis or relapse to collect enough blasts. Unfortunately, this method will not be reliable to follow the mitochondrial oxidative metabolism of AML blasts in the context of minimal residual disease. In this study, we investigated the metabolism of blasts from peripheral blood mononuclear cells of AML patients. However, it would also be possible to enrich the sample with blasts or with low-frequency subpopulation (as leukemic stem cells) after cell sorting or immunomagnetic isolation [29].

Further, we have shown that OCR assessments can be performed within 3 hr following blood draw and up to 18 hr if the blasts are maintained in full RPMI medium supplemented with cytokines. Cytokine supplementation is also required to measure the oxygen

345
346
347
348
349

350

351
352
353
354
355
356
357
358

359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370

371
372
373

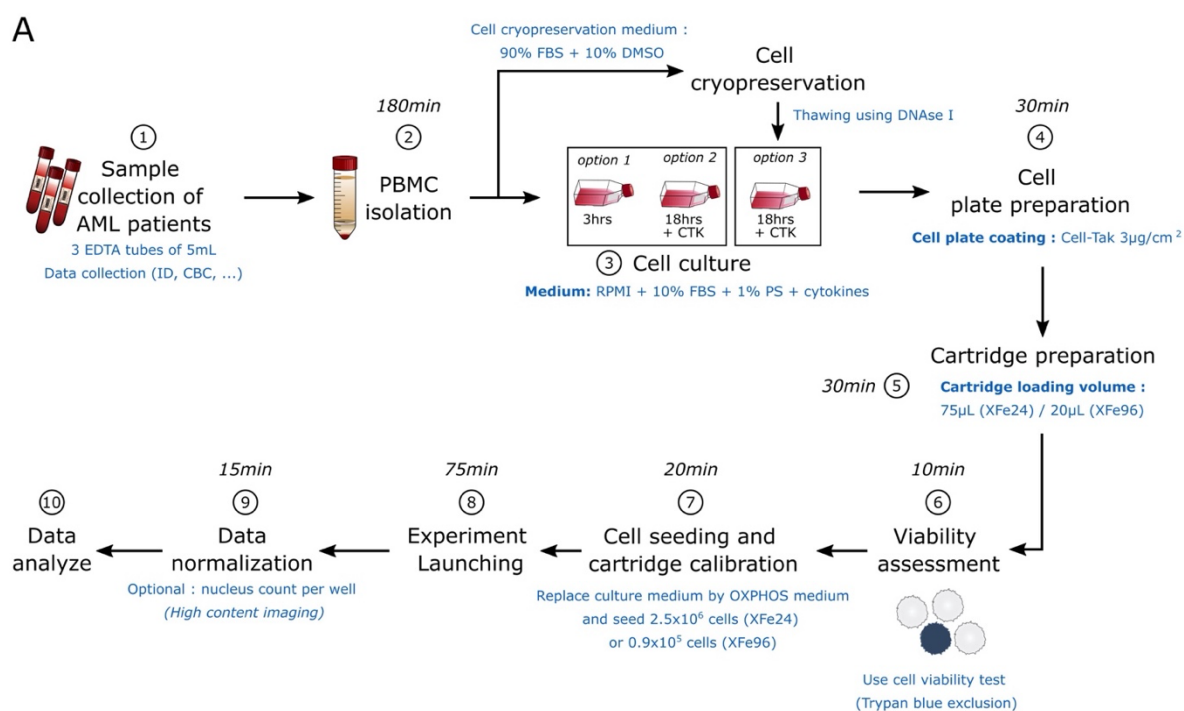
consumption of thawed blasts from cryopreserved samples. We proposed a culture medium including different cytokines because the heterogeneity of AML increases the difficulty of selective cytokine identification required for the survival of blasts from different patients [30]. Interestingly, we have shown that cytokine supplementation does not seem to erase metabolic differences between blasts since we observed different mitochondrial organizations in most of the blast samples.

Next, this study also underlies that the SRC value of blasts can be obtained only when using a range of concentrations of the uncoupler FCCP for each patient sample; analysis using a single dose of uncoupler should be avoided. Using the SRC to study mitochondrial function in blasts could offer several advantages. The SRC is one of the most robust parameters to determine mitochondrial activity, and its reliability lies in the fact that the SRC is reproducible and very sensitive for the determination of mitochondrial energetic adaptation capacity [31]. Importantly, Schimmer and collaborators showed that AML cells display a lower SRC than normal hematopoietic cells and suggested that this metabolic behavior could be targeted to eradicate AML cells [32].

Recently, gene signatures associated/related to mitochondrial metabolism, OXPHOS, and mitochondrial structures were identified by RNA sequencing. These signatures are predictive of patient response to cytarabine in patient-derived xenograft (PDX) models [21, 33] and shorter overall survival of patients from several transcriptomic databases [34]. However, mitochondrial gene signatures cannot fully reflect the dynamics of mitochondrial respiration and the redox homeostasis after various biological stresses. Monitoring mitochondrial oxygen consumption with mitochondrial gene signatures could further improve the prediction of drug response in AML patients, especially in clinical trials.

5. Conclusions

These protocols provided here can be used in future clinical studies to evaluate OXPHOS as a biomarker. Monitoring mitochondrial oxygen consumption of blasts could further improve the prediction of drug response in AML patients, especially for drugs targeting mitochondria.



374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

429

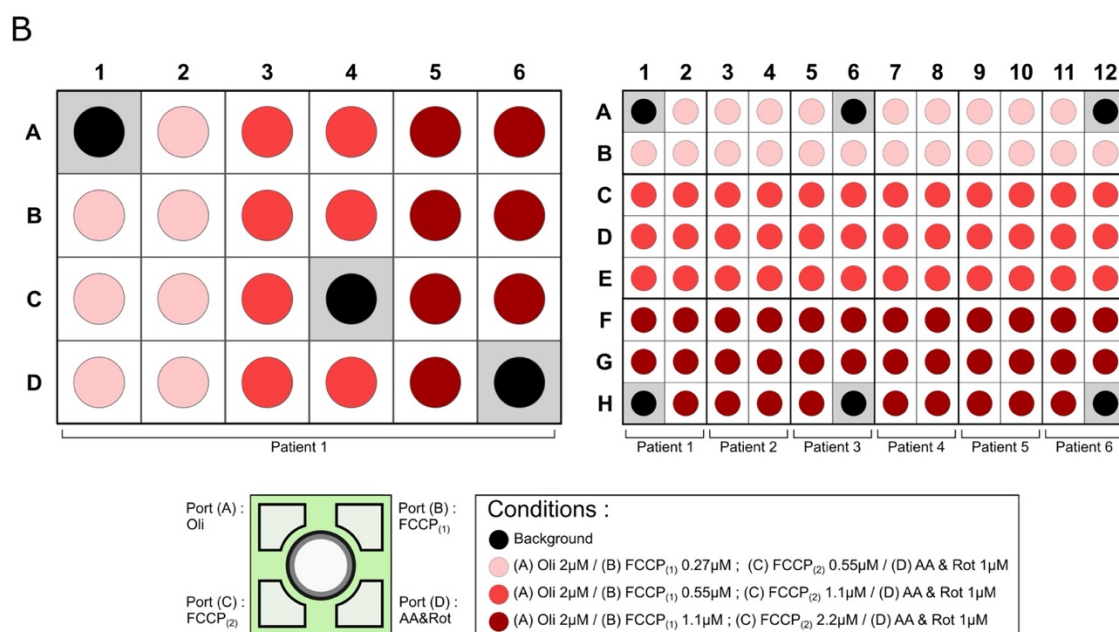


Figure 7. Schematic representation of the standardized protocol for evaluating OXPHOS in AML blasts. (A) Workflow representing each step required to analyze the OXPHOS of AML blasts with XFe24 or XFe96 Seahorse. The time required to complete each step is indicated. (B) Template organization of the plates used to analyze the OXPHOS parameters of the blasts from one AML patient with XFe24 Seahorse or for 6 AML patients with XFe96 Seahorse.

Author Contributions: “Conceptualization, J.K. and Q.F.; methodology, J.K, Q.F, W.L.; writing—original draft preparation, J.K, Q.F., P.M., J.E.S.; writing—review and editing, J.K., Q.F.; supervision, j.K.; funding acquisition, J.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.”

Funding: This work received financial support from INSERM, UNIVERSITE DE LILLE, Ligue contre le Cancer (to J.K.). Q.F. and C.D. are the recipients of a University of Lille and Haut de France Region fellowship. This work was also supported by a grant from Contrat de Plan Etat-Région CPER Cancer 2015-2020.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board of Tumorothèque/CHU Lille.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Acknowledgments: The authors thank Nathalie Jouy (BiCell-IFR114 flow cytometry platform) for her assistance with the flow cytometry analyses.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

404

405

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

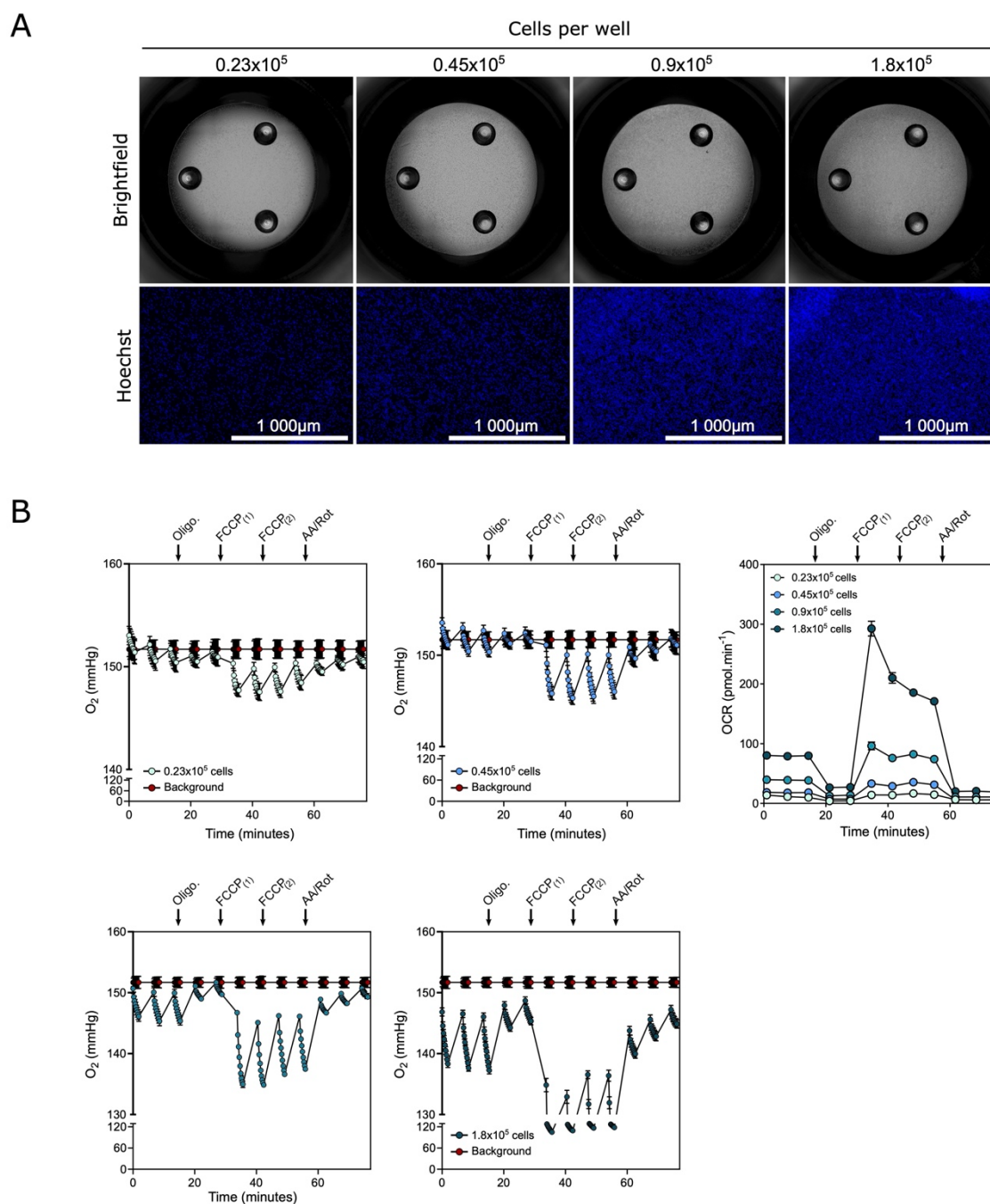
426

427

428

Appendix A

429



430

Figure supplementary 1. Number of AML cells required to measure oxygen consumption with XFe96 Seahorse. (A) Top panel: Cellular imaging of AML blasts (0.23×10^5 to 1.8×10^5 cells). Images display the wells of the XFe96 cell plates obtained by bright field light microscopy. Middle panel: Nuclei were stained using a Hoechst probe and visualized with a Cytation I fluorescence cell imager using a DAPI filter (scale bar = 1000 μm). (B) (Left) Oxygen levels (mmHg) measured in the medium surrounding the AML blasts according to the number of cells per well. At the times indicated (see black arrows), the following drugs were injected: oligomycin A (Oligo; 2 μM), FCCP1 (1.1 μM), FCCP2 (2.2 μM), antimycin A and rotenone (AA/Rot; 1 μM each). Red dots represent the oxygen levels measured in the wells containing only medium (used for background correction). (right) Oxygen consumption rate (OCR; $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1}$) of the blasts from AML patients according to the number of cells per well. Data are the means \pm SEM (at least $n = 3$ wells per group). All experiments were performed with blasts freshly collected from the blood of patient #21.

431
432
433
434
435
436
437
438
439
440

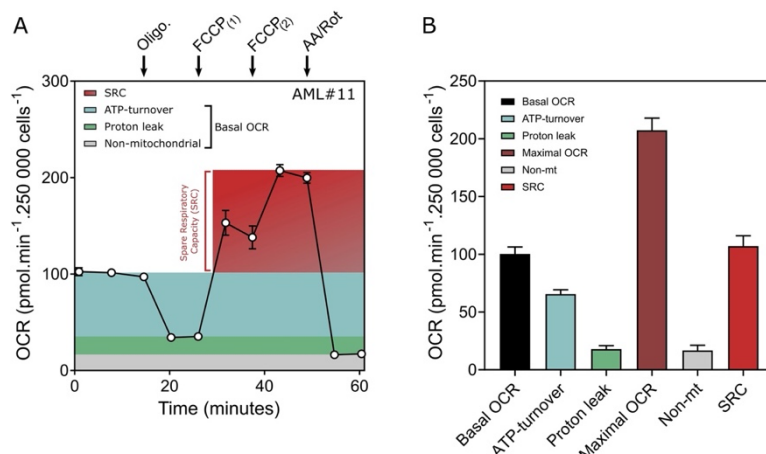


Figure supplementary 2. (A) Typical OCR assessment profile of the blasts from AML patients. The oxygen consumption rate (OCR; $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 250,000\text{ cells}^{-1}$) of the blasts from an AML patient. Data are the means \pm SEM (at least $n = 3$ wells). Experiments were performed with blasts freshly collected from the blood of patient #11 and cultivated for 18 hr in full RPMI medium supplemented with cytokines. At the times indicated (see black arrows), the following drugs were injected: oligomycin A (Oligo; $2\ \mu\text{M}$), FCCP1 ($1.1\ \mu\text{M}$), FCCP2 ($2.2\ \mu\text{M}$), antimycin A and rotenone (AA/Rot; $1\ \mu\text{M}$ each). (B) The basal OCR (blue + green + gray areas) of the blasts was determined between $t_0\text{min}$ to $t_{15}\text{min}$. After exposure to oligomycin A from $t_{20}\text{min}$ to $t_{26}\text{min}$, the OCR was related to the mitochondrial respiration used to generate ATP (ATP turnover, blue area). The remaining respiration, known as the proton leak (green area), is linked to oxygen-consuming mitochondrial processes independent of ATP production. Following exposure to FCCP (from $t_{32}\text{min}$ to $t_{51}\text{min}$), oxygen consumption increased until maximal oxygen consumption was reached. The mitochondrial spare respiratory capacity (SRC; red area) was calculated by subtracting the FCCP-stimulated OCR (maximal OCR) from the basal OCR. Finally, protein complexes I and III of the respiratory chain were inhibited by a mixture of rotenone and antimycin A to determine the nonmitochondrial respiration (gray area) of the blasts (from $t_{56}\text{min}$ to $t_{61}\text{min}$).

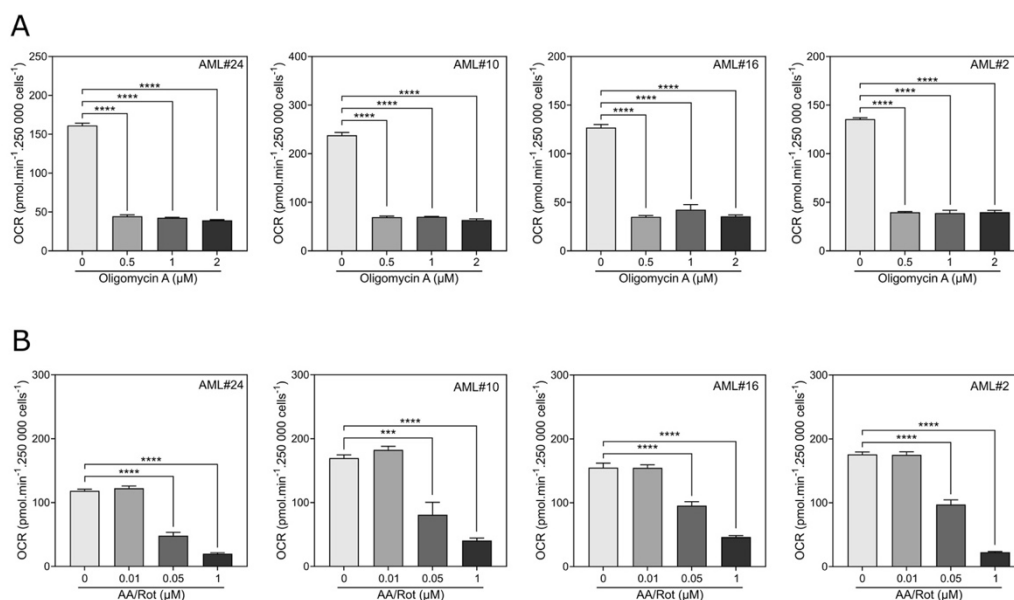


Figure supplementary 3. Inhibition of the oxygen consumption rate in AML blasts after exposure to oligomycin A or antimycin A/rotenone. (A) Oxygen consumption rate (OCR; $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 250,000\text{ cells}^{-1}$) of the blasts from AML patients after exposure to the indicated concentration of oligomycin A for 6 min. (B) Oxygen consumption rate (OCR; $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 250,000\text{ cells}^{-1}$) of the blasts from AML patients after exposure to the indicated concentrations of rotenone and antimycin A for 6 min (same concentration for both inhibitors). Data are the means \pm SEM (at least $n = 3$ wells per group). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ compared to the control. Experiments were performed with the blasts from the patients indicated in the upper right corner of each histogram.

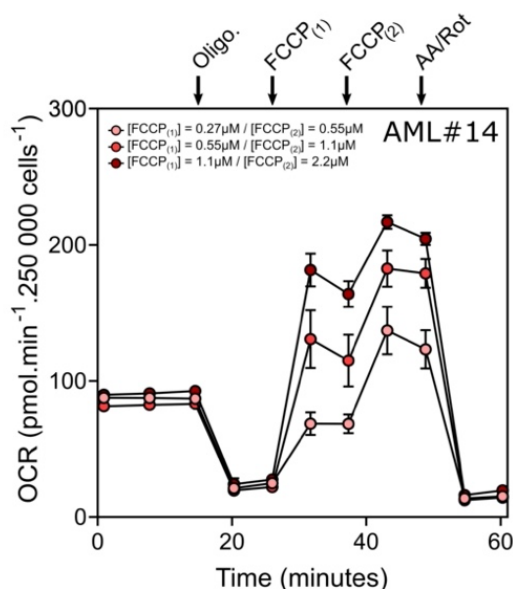


Figure supplementary 4. Typical OCR assessment profile of the blasts exposed to increasing concentrations of FCCP. The oxygen consumption rates (OCRs; $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 250,000\text{ cells}^{-1}$) of the blasts from AML patients were determined with XFe24 Seahorse (see Fig. 7B for template organization). Data are the means \pm SEM (at least $n = 3$ wells). Experiments were performed with blasts freshly collected from the blood of patient #14 and cultivated for 18 hr in full RPMI medium supplemented with cytokines. At the times indicated (see black arrows), the following drugs were injected: oligomycin A (Oligo; $2\ \mu\text{M}$), FCCP1 (see indicated concentration), FCCP2 (see indicated concentration), antimycin A and rotenone (AA/Rot; $1\ \mu\text{M}$ each).

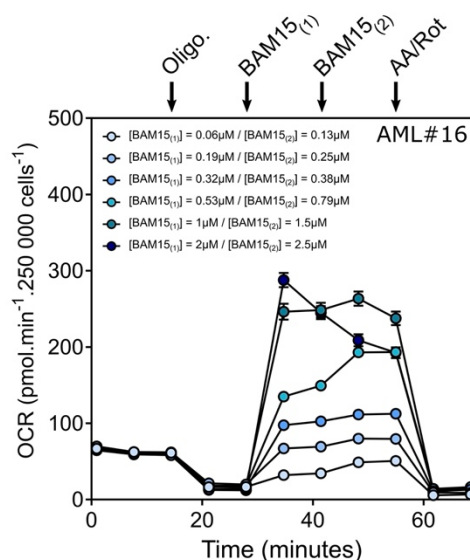


Figure supplementary 5. Typical OCR assessment profile of the blasts exposed to increasing concentrations of BAM15. The oxygen consumption rates (OCRs; $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 250,000\text{ cells}^{-1}$) of the blasts from AML patients were determined with XFe24 Seahorse. Data are the means \pm SEM (at least $n = 3$ wells). Experiments were performed with blasts thawed from the blood of patient #16 and cultivated for 18 hr in full RPMI medium supplemented with cytokines. At the times indicated (see black arrows), the following drugs were injected: oligomycin A (Oligo; $2\ \mu\text{M}$), BAM15(1) (see indicated concentrations), BAM15(2) (see indicated concentrations), antimycin A and rotenone (AA/Rot; $1\ \mu\text{M}$ each).

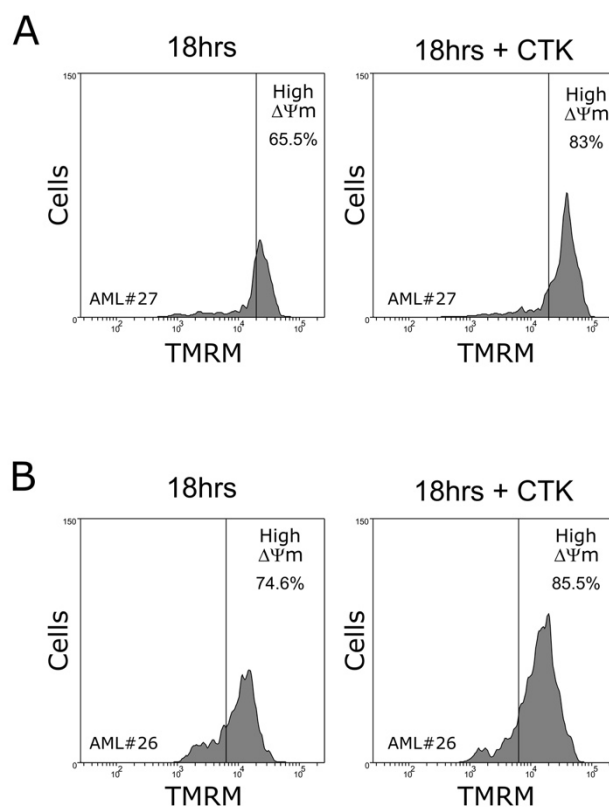


Figure supplementary 6. Mitochondrial membrane potential in living blasts cultured for 18 hr (from patients #27 and #26). Thawed blasts from the indicated AML patients were cultured in full RPMI (for 18 hr) or in full RPMI supplemented with cytokines (18 hr + CTK). Viable blasts were identified under both conditions by flow cytometry following Annexin V-APC and SYTOX blue staining, and the percentages of blasts with a high mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) were determined by TMRM labeling (percentages are indicated in the top right corner of the cytometry profile). Cytofluorimetric profiles are representative of two biological replicates.

Table supplementary 1. XFe96 Settings for mitochondrial OXPHOS measurement

Settings	Cycles	Mix	Wait	Measure	Total duration
Basal	3	2 min 20 s	2 min	2 min	19 min
Oligomycin	2	2 min 20 s	2 min	2 min	12 min 40 s
FCCP ₁	2	2 min 20 s	2 min	2 min	12 min 40 s
FCCP ₂	2	2 min 20 s	2 min	2 min	12 min 40 s
Antimycin A + Rotenone	3	2 min 20 s	2 min	2 min	19 min

References

- Shallis, R.M.; Wang, R.; Davidoff, A.; Ma, X.; Zeidan, A.M. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood Rev.* **2019**, *36*, 70–87. doi: 10.1016/j.blre.2019.04.005.
- Döhner, H.; Estey, E.; Grimwade, D.; Amadori, S.; Appelbaum, F. R.; Büchner, T.; Dombret, H.; Ebert, B. L.; Fenaux, P.; Larson, R. A., et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. **2017**, *Blood*, *129*, 424–447. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-733196>
- Hansen, D. K.; Kim, J.; Thompson, Z.; Hussaini, M.; Nishihori, T.; Ahmad, A.; Elmariah, H.; Faramand, R.; Mishra, A.; Davila, M. L. et al. ELN 2017 Genetic Risk Stratification Predicts Survival of Acute Myeloid Leukemia Patients Receiving Allogeneic

- Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **2021**, *Transplantation and cellular therapy*, *27*, 256.e1–256.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jtct.2020.12.021> 504
4. Herold, T.; Rothenberg-Thurley, M.; Grunwald, V. V.; Janke, H.; Goerlich, D.; Sauerland, M. C.; Konstandin, N. P.; Dufour, A.; Schneider, S.; Neusser, M. et al. Validation and refinement of the revised 2017 European LeukemiaNet genetic risk stratification of acute myeloid leukemia. **2020**, *Leukemia*, *34*, 3161–3172. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0806-0> 505
 5. Stuani, L.; Sabatier, M.; & Sarry, J. E. Exploiting metabolic vulnerabilities for personalized therapy in acute myeloid leukemia. **2019**, *BMC biology*, *17*, 57. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0670-4> 506
 6. Alvarez-Calderon, F.; Gregory, M. A.; Pham-Danis, C.; DeRyckere, D.; Stevens, B. M.; Zaberezhnyy, V.; Hill, A. A.; Gemta, L.; Kumar, A.; Kumar, V. et al. Tyrosine kinase inhibition in leukemia induces an altered metabolic state sensitive to mitochondrial perturbations. **2015**, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *21*, 1360–1372. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2146> 507
 7. Gregory, M. A.; Nemkov, T.; Park, H. J.; Zaberezhnyy, V.; Gehrke, S.; Adane, B.; Jordan, C. T.; Hansen, K. C.; D'Alessandro, A.; and DeGregori, J. Targeting Glutamine Metabolism and Redox State for Leukemia Therapy. **2019**, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *25*, 4079–4090. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-3223> 508
 8. Skrtić, M.; Sriskanthadevan, S.; Jhas, B.; Gebbia, M.; Wang, X.; Wang, Z.; Hurren, R.; Jitkova, Y.; Gronda, M.; Maclean, N. et al. Inhibition of mitochondrial translation as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia. **2011**, *Cancer cell*, *20*, 674–688. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.10.015> 509
 9. Bajpai, R.; Sharma, A.; Achreja, A.; Edgar, C. L.; Wei, C.; Siddiqua, A. A.; Gupta, V. A.; Matulis, S. M.; McBrayer, S. K.; Mittal, A. et al. Electron transport chain activity is a predictor and target for venetoclax sensitivity in multiple myeloma. **2020**, *Nature communications*, *11*, 1228. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15051-z> 510
 10. Molina, J. R.; Sun, Y.; Protopopova, M.; Gera, S.; Bandi, M.; Bristow, C.; McAfoos, T.; Morlacchi, P.; Ackroyd, J.; Agip, A. A. et al. An inhibitor of oxidative phosphorylation exploits cancer vulnerability. **2018**, *Nature medicine*, *24*, 1036–1046. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0052-4> 511
 11. Nelson, M. A.; McLaughlin, K. L.; Hagen, J. T.; Coalson, H. S.; Schmidt, C.; Kassai, M.; Kew, K. A.; McClung, J. M.; Neuffer, P. D.; Brophy, P. et al. Intrinsic OXPHOS limitations underlie cellular bioenergetics in leukemia. **2021**, *eLife*, *10*, e63104. <https://doi.org/10.7554/eLife.63104> 512
 12. Germain, N.; Dessein, A. F.; Vienne, J. C.; Dobbelaere, D.; Mention, K.; Joncquel, M.; Dekiok, S.; Laine, W.; Kluza, J. and Marchetti, P. First-line Screening of OXPHOS Deficiencies Using Microscale Oxygraphy in Human Skin Fibroblasts: A Preliminary Study. **2019**, *International journal of medical sciences*, *16*, 931–938. <https://doi.org/10.7150/ijms.32413> 513
 13. Dakik, H.; El Dor, M.; Leclerc, J.; Kouzi, F.; Nehme, A.; Deynoux, M.; Debeissat, C.; Khamis, G.; Ducrocq, E.; Ibrik, A. et al. Characterization of NADPH Oxidase Expression and Activity in Acute Myeloid Leukemia Cell Lines: A Correlation with the Differentiation Status. **2021**, *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *10*, 498. <https://doi.org/10.3390/antiox10030498> 514
 14. Ruas, J. S.; Siqueira-Santos, E. S.; Amigo, I.; Rodrigues-Silva, E.; Kowaltowski, A. J. and Castilho, R. F. Underestimation of the Maximal Capacity of the Mitochondrial Electron Transport System in Oligomycin-Treated Cells. **2016**, *PloS one*, *11*, e0150967. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150967> 515
 15. Kenwood, B. M.; Weaver, J. L.; Bajwa, A.; Poon, I. K.; Byrne, F. L.; Murrow, B. A.; Calderone, J. A.; Huang, L.; Divakaruni, A. S.; Tomsig, J. L. et al. Identification of a novel mitochondrial uncoupler that does not depolarize the plasma membrane. **2013**, *Molecular metabolism*, *3*, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2013.11.005> 516
 16. Scotland, S.; Saland, E.; Skuli, N.; de Toni, F.; Boutzen, H.; Micklow, E.; Sénégas, I.; Peyraud, R.; Peyriga, L.; Théodoro, F. et al. Mitochondrial energetic and AKT status mediate metabolic effects and apoptosis of metformin in human leukemic cells. **2013**, *Leukemia*, *27*, 2129–2138. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.107> 517
 17. Mirali, S.; Botham, A.; Voisin, V.; Xu, C.; St-Germain, J.; Sharon, D.; Hoff, F. W.; Qiu, Y.; Hurren, R.; Gronda, M. et al. The mitochondrial peptidase, neurolysin, regulates respiratory chain supercomplex formation and is necessary for AML viability. **2020**, *Science translational medicine*, *12*, eaaz8264. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaz8264> 518
 18. Baccelli, I.; Gareau, Y.; Lehnertz, B.; Gingras, S.; Spinella, J. F.; Corneau, S.; Mayotte, N.; Girard, S.; Frechette, M.; Blouin-Chagnon, V. et al. Mubritinib Targets the Electron Transport Chain Complex I and Reveals the Landscape of OXPHOS Dependency in Acute Myeloid Leukemia. **2019**, *Cancer cell*, *36*, 84–99.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.06.003> 519
 19. Jones, C. L.; Stevens, B. M.; D'Alessandro, A.; Culp-Hill, R.; Reisz, J. A.; Pei, S.; Gustafson, A.; Khan, N.; DeGregori, J.; Pollyea, D. A. and Jordan, C. T. Cysteine depletion targets leukemia stem cells through inhibition of electron transport complex II. **2019**, *Blood*, *134*, 389–394. <https://doi.org/10.1182/blood.2019898114> 520
 20. Jones, C. L., Stevens, B. M., D'Alessandro, A., Reisz, J. A., Culp-Hill, R., Nemkov, T., Pei, S., Khan, N., Adane, B., Ye, H., et al. Inhibition of Amino Acid Metabolism Selectively Targets Human Leukemia Stem Cells. **2018**, *Cancer cell*, *34*(5), 724–740.e4. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.10.005> 521
 21. Farge, T.; Saland, E.; de Toni, F.; Aroua, N.; Hosseini, M.; Perry, R.; Bosc, C.; Sugita, M.; Stuani, L.; Fraisse et al. Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. **2017**, *Cancer discovery*, *7*, 716–735. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0441> 522
 22. Salunkhe, S.; Mishra, S. V.; Ghorai, A.; Hole, A.; Chandrani, P.; Dutt, A.; Chilakapati, M.; and Dutt, S. Metabolic rewiring in drug resistant cells exhibit higher OXPHOS and fatty acids as preferred major source to cellular energetics. **2020**, *Biochimica et biophysica acta. Bioenergetics*, *1861*, 148300. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148300> 523

23. Chen, D.; Xia, S.; Wang, M.; Lin, R.; Li, Y.; Mao, H.; Aguiar, M.; Famulare, C. A.; Shih, A. H.; Brennan et al. Mutant and Wild-Type Isocitrate Dehydrogenase 1 Share Enhancing Mechanisms Involving Distinct Tyrosine Kinase Cascades in Cancer. **2019**, *Cancer discovery*, *9*, 756–777. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-1040> 563
564
565
24. Sharon, D.; Cathelin, S.; Mirali, S.; Di Trani, J. M.; Yanofsky, D. J.; Keon, K. A.; Rubinstein, J. L.; Schimmer, A. D.; Ketela, T. and Chan, S. M. Inhibition of mitochondrial translation overcomes venetoclax resistance in AML through activation of the integrated stress response. **2019**, *Science translational medicine*, *11*, eaax2863. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aax2863> 566
567
568
25. Lin, K. H.; Xie, A.; Rutter, J. C.; Ahn, Y. R.; Lloyd-Cowden, J. M.; Nichols, A. G.; Soderquist, R. S.; Koves, T. R.; Muoio, D. M.; MacIver, N. J. et al. Systematic Dissection of the Metabolic-Apoptotic Interface in AML Reveals Heme Biosynthesis to Be a Regulator of Drug Sensitivity. **2019**, *Cell metabolism*, *29*, 1217–1231.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.01.011> 569
570
571
26. Savona, M. R. and Rathmell, J. C. Mitochondrial Homeostasis in AML and Gaspung for Response in Resistance to BCL2 Blockade. **2019**, *Cancer discovery*, *9*, 831–833. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0510> 572
573
27. Stuani, L.; Sabatier, M.; Saland, E.; Cognet, G.; Poupin, N.; Bosc, C.; Castelli, F. A.; Gales, L.; Turtoi, E.; Montersino, C. et al. Mitochondrial metabolism supports resistance to IDH mutant inhibitors in acute myeloid leukemia. **2021**, *The Journal of experimental medicine*, *218*, e20200924. <https://doi.org/10.1084/jem.20200924> 574
575
576
28. Bosc, C.; Saland, E.; Bousard, A.; Gadaud, N.; Sabatier, M.; Cognet, G., Farge, T.; Boet, E.; Gotanègre, M.; Aroua, N. et al. Mitochondrial determinants of response and resistance to venetoclax plus cytarabine duplet therapy in acute myeloid leukemia. **2021**, *Nature Cancer*. In press. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.08.17.253856> 577
578
579
29. Ho, J. M.; Dobson, S. M.; Voisin, V.; McLeod, J.; Kennedy, J. A.; Mitchell, A.; Jin, L.; Eppert, K.; Bader, G.; Minden et al. CD200 expression marks leukemia stem cells in human AML. **2020**, *Blood advances*, *4*, 5402–5413. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020001802> 580
581
582
30. Stiehl, T.; Ho, A. D. and Marciniak-Czochra, A. Mathematical modeling of the impact of cytokine response of acute myeloid leukemia cells on patient prognosis. **2018**, *Scientific reports*, *8*, 2809. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21115-4> 583
584
31. Marchetti, P.; Fovez, Q.; Germain, N.; Khamari, R. and Kluza, J. Mitochondrial spare respiratory capacity: Mechanisms, regulation, and significance in non-transformed and cancer cells. **2020**, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *34*, 13106–13124. <https://doi.org/10.1096/fj.202000767R> 585
586
587
32. Sriskanthadevan, S.; Jeyaraju, D. V.; Chung, T. E.; Prabha, S.; Xu, W.; Skrtic, M.; Jhas, B.; Hurren, R.; Gronda, M.; Wang et al. AML cells have low spare reserve capacity in their respiratory chain that renders them susceptible to oxidative metabolic stress. **2015**, *Blood*, *125*, 2120–2130. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-08-594408> 588
589
590
33. Aroua, N.; Boet, E.; Ghisi, M.; Nicolau-Travers, M. L.; Saland, E.; Gwilliam, R.; de Toni, F.; Hosseini, M.; Mouchel, P. L.; Farge, T. et al. Extracellular ATP and CD39 Activate cAMP-Mediated Mitochondrial Stress Response to Promote Cytarabine Resistance in Acute Myeloid Leukemia. **2020**, *Cancer discovery*, *10*, 1544–1565. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-1008> 591
592
593
34. Luna-Yolba, R.; Marmoiton, J.; Gigo, V.; Marechal, X.; Boet, E.; Sahal, A.; Alet, N.; Abramovich, I.; Gottlieb, E.; Visentin, V. et al. Disrupting Mitochondrial Electron Transfer Chain Complex I Decreases Immune Checkpoints in Murine and Human Acute Myeloid Leukemic. **2021**, *Cancers*, *13*, 3499. <https://doi.org/10.3390/cancers13143499> 594
595
596

Partie II : Mitochondrial spare reserve capacity : a new predictive metabolic biomarker for aggressiveness of acute myeloid leukemia

(Manuscrit en préparation)

Quentin Fovez, Claire Degand, Patrick Devos, William Laine, Céline Berthon, Laure Goursaud, Nicolas Germain, Claude Preudhomme, Philippe Marchetti, Bruno Quesnel, Jean-Emmanuel Sarry and Jérôme Kluza (ordre des auteurs provisoires en l'état de l'avancée du manuscrit)

Introduction

La persistance des cellules leucémiques après traitement limite l'efficacité des médicaments anticancéreux et est à l'origine de rechutes dans la leucémie aiguë myéloïde (LAM). Cette survie des cellules leucémiques est principalement soutenue par le métabolisme énergétique mitochondrial. L'évaluation de l'activité bioénergétique mitochondriale des blastes de patients atteints de LAM pourrait donc fournir des informations prédictives sur la réponse au traitement.

Dans cette étude, nous avons déterminé : les valeurs prises par les différentes composantes énergétiques liées à la consommation d'oxygène ou à la glycolyse à partir de quelques modèles de cellules hématopoïétiques saines ou de blastes issus de patients atteints de LAM. A l'aide d'approches statistiques (Hazard Ratio), nous avons recherché les éventuelles corrélations entre les différents états mesurables de la consommation d'oxygène ou de la glycolyse et le pronostic de survie des patients. Enfin, nous avons déterminé quels sont les substrats privilégiés par les blastes pour soutenir le fonctionnement du métabolisme énergétique mitochondrial que ce soit de manière basale ou lors de l'accélération de la chaîne respiratoire par le FCCP (condition de capacité de réserve respiratoire).

Matériel et Méthode

Lignées cellulaires

Les cellules leucémiques MOLM-13, HL-60, THP-1, OCI-AML3, KG1, U937 ont été cultivées à 37°C et 5% de CO₂ dans du RPMI Medium 1640 (1X) + GlutaMAX™-I (Gibco) supplémenté avec 20% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Invitrogen®) et 1% de pénicilline & streptomycine (Invitrogen®).

Echantillons de patients

Les échantillons de LAM ont été obtenus auprès de patients hospitalisés entre 2018 et 2021 au sein du service d'hématologie du CHU de Lille, après obtention de leur consentement éclairé conformément à la Déclaration d'Helsinki et l'approbation du comité d'éthique institutionnel (CPP Lille). Afin d'isoler les cellules mononuclées, les échantillons de sang ou de moelle osseuse ont été dilués au demi avec du PBS et placés sur du Pancoll human (d = 1,077 g/mL) (PAN-Biotech®). Les échantillons ont ensuite été centrifugés pendant 30 minutes (400g – Acc.1 Dec. 1). Les cellules mononuclées ont ensuite été collectées et lavées deux fois dans du PBS avec une centrifugation de 5 minutes (300g – Acc.9 Dec.9). Si nécessaire, les globules rouges ont été lysés avec un tampon de lyse osmotique (0,1 M de KHCO₃, 1,55 M de NH₄Cl et 0,037 g de Na₂EDTA). Après isolement, le nombre de cellules et la viabilité ont été évalués à l'aide d'un compteur de cellules (Z2 Coulter Counter) et d'un test de viabilité (LUNA-FL™ Dual Fluorescence Cell Counter) (bleu trypan ou orange d'acridine/IP). Lorsque cela était possible, les cellules mononuclées ont été cryoconservées dans un milieu de cryoconservation (90 % de sérum de veau foetal (Gibco®) + 10 % de DMSO (Sigma®)). Les tubes cryogéniques ont été placés dans une cryoboîte contenant de l'isopropanol et qui a ensuite été placée à -80°C pendant 2 à 3 jours puis ont été transférés dans un réservoir d'azote pour une conservation à long terme. Les échantillons ont été décongelés dans du milieu RPMI Medium 1640 (1X) + GlutaMAX™-I (Gibco®) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (Invitrogen®) et 1% de pénicilline & streptomycine (Invitrogen®) et 100 µg/mL de DNase I 1X (Sigma®). Les cellules mononuclées ont été cultivées à 37°C et 5% de CO₂ dans du milieu RPMI Medium 1640 (1X) + GlutaMAX™-I (Gibco®) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (Invitrogen®) et 1% de pénicilline & streptomycine (Invitrogen®) et un cocktail de cytokines contenant 10 ng/mL d'interleukines (IL)-3, (IL)-6, (IL)-7, facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF), 50 ng/mL de Fms-like tyrosine kinase 3 ligand (FLT3L), 5 ng/mL de facteur de stimulation des colonies de macrophages granulocytaires (GM-CSF) et 25 ng/mL de facteur de cellules souches (SCF) (Peprotech).

En parallèle de cette étude prospective, nous avons également développé une collaboration avec l'équipe de recherche du Dr. Jean-Emmanuel Sarry ce qui nous a permis d'enrichir notre cohorte de 21 patients supplémentaires.

Cellules saines hématopoïétiques

Les cellules hématopoïétiques saines (monocytes et cellules sanguines mononuclées périphériques) ont toutes été obtenues auprès de l'EFS. Les cellules dendritiques dérivées de monocytes (MDC) ont été générées comme décrit précédemment (205).

Produits chimiques

L'oligomycine A, le FCCP, l'antimycine A, la roténone, l'etomoxir, le BPTES, l'UK5099, le dichloroacétate et le méthyle pyruvate ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich®. Pour l'oligomycine A, le FCCP, l'antimycine A, la roténone, l'etomoxir, le BPTES et l'UK5099, des solutions mères de 10 mM ou 2,5 mM ont été préparées dans du DMSO stérile et conservées à -20°C.

Mesure de la consommation d'oxygène et de l'acidification du milieu extracellulaire

Les mesures de la consommation d'oxygène (OCR) et de l'acidification du milieu extracellulaire (ECAR) ont été réalisées à l'aide de l'analyseur Seahorse XFe24 ou Seahorse XFe96 (Seahorse Bioscience®, Billerica, MA, USA). Les microplaques Seahorse XFe24 et XFe96 ont été pré-traitées avec 3 µg/cm² de Corning™ Cell-Tak (Fisher Scientific®) pour l'analyse des cellules mononuclées ou avec de la poly-L-lysine (Sigma-Aldrich®) pour l'analyse des lignées cellulaires. Pour l'analyse de la phosphorylation oxydative les cellules ont été resuspendues dans un milieu DMEM (D5030, Sigma-Aldrich®) contenant de la L-glutamine (2 mM), du glucose (10 mM) et du pyruvate (1 mM). Ce milieu a été équilibré à un pH=7,35 à 37°C. Pour les analyses au XFe24, les cellules ont étéensemencées à 250 000 cellules/100 µL/puits pour les cellules issues de patients ou 150 000 cellules/100 µL/puits pour les lignées cellulaires. Pour les analyses au XFe96, les cellules ont étéensemencées à 90 000 cellules/50 µL/puits pour les cellules issues de patients ainsi que pour les lignées cellulaires. Afin d'accélérer la sédimentation cellulaire, les plaques ont été centrifugées deux fois à basse vitesse (600 rpm). La plaque a ensuite été incubée pendant 20 min à 37°C dans un incubateur sans CO₂, après cela 400 µL (XFe24) ou 100 µL (XFe96) de milieu chaud ont été ajoutés dans chaque puits juste avant le début de l'analyse. Pour la mesure OCR, les molécules suivantes ont été utilisées : oligomycine A (2 µM), FCCP (0,27-2,2 µM), roténone (1 µM) et antimycine A (1 µM).

Imagerie cellulaire

L'imagerie cellulaire a été réalisée à l'aide du lecteur multimode Cytation1 (BioTek®, VT, USA). L'acquisition du signal de fluorescence du Hoechst (utilisé à une concentration finale de 35,5 µM) a été réalisée à l'aide d'une LED de 365 nm en combinaison avec un filtre EX 377/50 EM 447/60 dans un environnement thermostaté à 37°C. L'analyse des images a été réalisée à l'aide du logiciel Gen5 (BioTek).

Transduction lentivirale

La lignée MOLM-13 a été infectée à l'aide de lentivirus porteurs de séquences shARN différentes ciblant le MPC2 (LPP-HSH065761-LVRU6GP-a/b/c – GeneCopoeia®). Une 4^e

séquence contrôle (LPP- CSHCTR001-LVRU6GP – GeneCopoeia®) a également été utilisée pour générer une lignée infectée dans laquelle aucune protéine n'est ciblée de manière spécifique. Les infections ont été réalisées à des MOI (Multiplicity of infection) de 5 et 10 par spinoculation (centrifugation à 800g pendant 30 minutes à 32 °C). Après 72h de culture, les cellules ayant été infectées ont été sélectionnées à l'aide de puromycine (1 µg.mL⁻¹) (Gibco®). La pression de sélection par la puromycine a été maintenue pendant une semaine. A l'exception de la lignée MOLM-13 contrôle, l'ensemble des lignées a été cloné en réalisant un tri cellulaire à l'aide d'un trieur de cellules (SONY SH800S). Les différentes lignées clonales ont ensuite été amplifiées et l'expression du MPC2 dans chacune d'entre elles a été déterminée par Western Blot.

Analyse par cytométrie de flux

La viabilité cellulaire, le potentiel de la membrane mitochondriale et la production mitochondriale de ROS ont été respectivement évalués par Annexin V-APC (0,45 µg par échantillon, 10 min, 20°C) (Biolegend®), Sytox blue (1 µM, 10 min, 20°C) (Thermo Fisher Scientific®), TMRM (100 nM, 30 min, 37°C) (Thermo Fisher Scientific®) et MitoSOX (2,5 µM, 30 min, 37°C) (Thermo Fisher Scientific®). Les niveaux de fluorescence après coloration cellulaire ont été analysés par LSRFortessa X20 (Becton Dickinson®).

Western Blot

Des lysats cellulaires ont été préparés à l'aide d'un tampon RIPA (150 mM NaCl, 1,0% IGEPAL® CA-630, 0,5% sodium deoxycholate, 0,1% SDS, 50 mM Tris, pH 8,0) contenant 10% de PIC (Protease inhibitor cocktail), 1% de NaF, 1% de sodium orthovanadate et 1% de PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride). Les cellules ont été incubées dans ce tampon pendant 30 minutes à 4°C. Puis le lysat a été centrifugé à 16 000g pendant 10 minutes. 20 µg de protéines ont ensuite été séparées sur un gel SDS-PAGE 4-12 % et ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose. Après blocage pendant 1 heure dans du lait ou de la sérum albumine bovine à 10% dans du tampon TBS-Tween selon les recommandations du fabricant, les membranes ont ensuite été exposées aux anticorps (1:1 000 pour les anticorps primaires et 1:2 000 pour les anticorps secondaires) comme décrit dans le Tableau 6. Les anticorps secondaires, conjugués à la peroxidase (Limerick®, PA), ont été mis en présence des membranes pendant 1 heure puis la détection a été effectuée par chimioluminescence en ajoutant de l'ECL (GE Healthcare) et l'émission chimioluminescente produite par l'HRP a été détectée à l'aide de l'ImageQuant LAS4000.

Anticorps primaire	Poids moléculaire	Référence	Dilution anticorps primaire	Dilution anticorps secondaire
MPC2 (monoclonal)	14 kDa	#46141	1/1 000 BSA	1/2 000 BSA (R)
B-Actine (monoclonal)	45 kDa	SC-47778	1/1 000 lait	1/2 000 lait (M.M)

Tableau 6. Anticorps primaires utilisés pour la quantification protéique par Western Blot et leurs caractéristiques. R = Rabbit ; M = Mouse

Métabolomique

Les expériences de métabolomique ont été menées sur la lignée cellulaire MOLM-13. Juste avant le début de l'expérimentation les cellules ont été centrifugées (130g - 5minutes) et remises en suspension dans du milieu DMEM (Gibco®) contenant uniquement de l'[U13C]-Glucose (4,5g/L) et de la L-glutamine (0,3g/L) (Sigma®) ou contenant du D-glucose (4,5g/L) et de l'[U13C]-Glutamine (0,3g/L). La consommation d'oxygène a été mesurée pendant 70 minutes à l'Oroboros O2k, durant les premières minutes la consommation d'oxygène basale a été stabilisée puis de l'oligomycine A a été injecté dans une seule des deux chambres. Une fois que l'oligomycine A a atteint son effet maximal, des injections de FCCP sont réalisées jusqu'à atteindre une consommation d'oxygène égale à deux fois la consommation d'oxygène basale. A la fin de l'expérience les cellules ont été collectées et placées à 4°C. Pour chaque condition 200 000 cellules ont été lysées à l'aide du tampon d'extraction méthanol-acetonitrile 10mM – Tris.Hcl pH 9,4. Les solutions d'extractions ont ensuite été centrifugées à 20 000g pendant 10 minutes à 4°C, puis le surnageant a été récupéré et stocké à -80°C. Les métabolites extraits ont été quantifiés *via* spectrométrie de masse par l'équipe du Pr. Bart Ghesquière (VIB, KU Leuven). Les résultats de Pathway Impact ont été générés à l'aide de MetaboAnalyst v5.0.

Analyses statistiques

A l'exception des données de Seahorse, qui sont représentées sous forme de moyenne \pm SEM, toutes les données sont représentées sous forme de moyennes \pm SD. Le test t de Student bilatéral a été utilisé pour comparer les valeurs moyennes entre deux groupes. Une analyse de variance unidirectionnelle ou bidirectionnelle (ANOVA) suivie de tests post hoc de Dunnett ou de Sidak a été utilisée pour comparer les valeurs moyennes entre plusieurs groupes. Ces analyses ont été réalisées à l'aide de Prism version 6.0f (GraphPad Software, La Jolla, CA). Pour les comparaisons des groupes high SRC et low SRC les tests du Chi2 ou le test exact de Fisher ont été utilisés. Les taux de survie ont été estimés avec la méthode de Kaplan-Meier et ont été comparés à l'aide du test du log-rank. Après analyse univariée, les variables significatives ($p < 0,05$) ont ensuite été intégrées dans une procédure de sélection en amont pour maintenir les facteurs significatifs dans le modèle de Cox multivarié final. Ces analyses

ont été réalisées en utilisant SAS V9.4 (Cary, NC, USA). Pour l'ensemble des tests menés, les valeurs p rapportées sont bilatérales et les valeurs p inférieures à 0,05 sont considérées comme statistiquement significatives.

Résultats

1. Evaluation du métabolisme énergétique des cellules hématopoïétiques saines et des blastes issus de patients atteints de LAM

1.1 Mesure des paramètres de la consommation d'oxygène des cellules hématopoïétiques saines

Dans un premier temps, nous avons mesuré les différents paramètres reliés à la consommation d'oxygène de cellules hématopoïétiques saines (HHC) mononuclées. Pour se faire nous avons évalué la consommation d'oxygène dans différents états : basale (en absence d'inhibiteur), dépendante de la production d'ATP (ATP-turnover), reliée à la fuite de protons (proton leak), maximale après l'injection de FCCP, capacité de réserve respiratoire qui est la différence entre la consommation basale et maximale (SRC) et non-mitochondriale après l'inhibition de la chaîne respiratoire par l'antimycine A et la roténone. Parmi les types cellulaires mononuclées nous avons choisi d'évaluer tout d'abord les paramètres de la consommation d'oxygène des cellules sanguines mononuclées périphériques (PBMC) qui sont composées de lymphocytes (88% à 96%) et de monocytes (4 à 12%) (206), puis de cellules dérivées plus spécifiquement de la lignée myéloïde.

1.1.1 Mesure des paramètres de la consommation d'oxygène des PBMC de sujets sains

La mesure de la consommation d'oxygène des cellules sanguines mononuclées périphériques (PBMC) de 6 sujets sains montre que ce type cellulaire présente une moyenne de consommation d'oxygène basale (Basal OCR) de $69,36 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ (Figure 17 – A). ; une moyenne de consommation d'oxygène dépendante de la production d'ATP (ATP-turnover) de $104,5 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ (Figure 17 – B) ; une moyenne de consommation d'oxygène reliée à la fuite de protons (Proton leak) de $21,65 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ (Figure 17 – C) ; une moyenne de consommation d'oxygène maximale (Maximal OCR) de $405,6 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ (Figure 17 – D) ; une moyenne de capacité de réserve respiratoire (SRC) de $258,3 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ (Figure 17 – E) et une moyenne de consommation d'oxygène non-mitochondriale (Non-mt) de $21,18 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$. (Figure 17 – F).

1.1.2 Mesure des paramètres de la consommation d'oxygène de deux modèles de cellules myéloïdes de sujets sains

Afin d'étudier plus spécifiquement le métabolisme de cellules saines myéloïdes, nous avons isolés des monocytes à partir de deux sujets sains afin d'étudier un modèle à un stade intermédiaire de différenciation. Puis à partir de 4 concentrés de leucocytes de patients sains,

nous avons isolé les monocytes et les avons différenciés en cellules dendritiques (MDC) afin d'obtenir un modèle à un stade terminal de différenciation (cf Matériel & Méthode).

La mesure de la consommation d'oxygène basale (Basal OCR) montre que les cellules dendritiques (MDC) ont une consommation moyenne de $405,1 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ qui est significativement supérieure à celle des monocytes (Mono) qui est de $69,36 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ (Figure 17 – A).

La mesure de la consommation d'oxygène dépendante de la production d'ATP (ATP-turnover) montre que les MDC ont une consommation moyenne de $288,3 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ qui est significativement supérieure et à celle des monocytes qui est de $44,87 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ (Figure 17 – B).

La mesure de la consommation d'oxygène reliée à la fuite de protons (Proton leak) montre que les MDC ont une consommation moyenne de $55,79 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ qui est significativement supérieure à celle des monocytes qui est de $8,36 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ (Figure 17 – C).

La mesure de la consommation d'oxygène maximale (Maximal OCR) montre que les MDC ont une consommation moyenne de $1\,189 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ qui est significativement supérieure à celle des monocytes qui est de $111,6 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ (Figure 17 – D).

La mesure de la capacité de réserve respiratoire (SRC) montre que les MDC ont une consommation moyenne de $783,8 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ qui est significativement supérieure à celle des monocytes qui est de $42,28 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ (Fig X – E).

La mesure de la consommation d'oxygène non-mitochondriale (Non-mt) montre que les MDC ont une consommation moyenne de $60,95 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ qui est significativement supérieure à celle des monocytes qui est de $16,14 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ (Figure 17 – F).

A partir de ces deux modèles de cellules myéloïdes issues de sujets sains, nos résultats montrent que toutes les cellules mononuclées (PBMC, monocytes, MDC) n'ont pas le même métabolisme oxydatif. La comparaison entre les valeurs de consommation d'oxygène des monocytes et des MDC montre que les MDC ont un métabolisme oxydatif bien plus important que celui des monocytes. Dans l'ensemble ces résultats mettent donc en évidence l'existence de différents phénotypes oxydatifs chez les cellules saines hématopoïétiques.

1.2 Mesure des paramètres de la consommation d'oxygène des blastes de patients atteints de LAM

1.2.1 Caractéristique de la cohorte de patients atteints de LAM

A partir des résultats obtenus dans la première partie de cette thèse (Résultat - Partie I), nous avons choisi de mettre en place une étude prospective, entre novembre 2018 et mars 2021, au cours de laquelle nous avons mesuré la consommation d'oxygène de blastes issus de 58 patients atteints de LAM (Tableau 7).

Cette cohorte est composée de 27 femmes et de 31 hommes dont la moyenne d'âge est de 61,7 ans (min = 23 ans ; max = 88 ans). Parmi ces patients 4 ont une LAM de type M0 ; 12 ont une LAM de type M1 ; 7 ont une LAM de type M2 ; 1 a une LAM de type M3 ; 12 ont une LAM de type M4 ; 11 ont une LAM de type M5 (dont 4 patients de sous-type M5a et 1 patient de type M5b) ; deux patients ne sont pas classés car ils présentent une LAM secondaire. La répartition selon la classification ELN est la suivante : 9 patients dans le groupe favorable (ELN-1), 19 dans le groupe intermédiaire (ELN-2), 17 patients dans le groupe défavorable (ELN-3) et 4 patients ne sont pas classés.

Patient ID	Age	Sex	FAB	ELN	Blasts (%)	Cytogenetic
AML#41	61	F	M4	3	41	-
AML#22	60	F	M0	2	15	SETP-NUP214
AML#73	63	F	M5a	3	66	KMT2A-MLLT3, surexpression EVI1
AML#61	78	M	M2	3	22	-
AML#68	57	M	M0	2	ND	-
AML#58	34	M	Inclassable	3	87	-
AML#71	48	F	M2	3	84	-
AML#62	49	F	-	-	60	-
AML#56	35	M	M5	-	100	-
AML#66	46	F	M2	1	19	-
AML#52	60	M	M2	3	15	-
AML#51	71	M	M5a	3	82	-
AML#16	74	M	M1	2	97	-
AML#67	74	M	M0	2	ND	-
AML#72	81	F	M4	2	91	-
AML#50	75	F	M1	2	48	-
AML#30	59	M	M4	2	46	Surexpression EVI1
AML#38	48	F	M2	1	58	-
AML#39	72	M	M4	1	62	-
AML#28	77	M	Inclassable	3	14	-
AML#35	67	M	M3	1	64	PML-RARA
AML#31	65	M	Inclassable	3	13	-
AML#43	70	M	M1	2	78	-
AML#64	65	M	M2	-	47	-

AML#55	86	F	M4	3	38	-
AML#27	58	F	M5b	2	55	KMT2A-MLLT3, surexpression EVI1
AML#63	67	F	M1	2	67	-
AML#45	67	F	Inclassable	2	59	-
AML#29	62	F	M5a	3	27	DEK-CAN
AML#37	86	F	Inclassable	3	71	-
AML#49	69	M	M0	3	23	-
AML#54	88	F	M5a	3	81	-
AML#59	76	F	Inclassable	NA	38	-
AML#44	69	M	M4	3	87	RUNX1
AML#65	54	M	M1	1	15	-
AML#48	50	M	M1	2	88	-
AML#60	58	F	Inclassable	2	84	-
TUH#07	52	M	M4	1	23	-
TUH#171	58	M	M1	2	95	-
TUH#166	43	M	M5	-	97	KMT2A-MLLT3 (MLL-AF9)
TUH#161	46	M	M4	2	44	-
TUH#164	50	M	M4	3	20	ATM
TUH#28	77	F	M1	3	94	-
TUH#170	38	M	M5	3	88	-
TUH#87	23	F	M5	2	73	-
TUH#10	64	F	M5	2	58	-
TUH#163	60	F	M4	2	4	-
TUH#162	63	F	M1	2	96	-
TUH#165	78	M	2ndR_SMD	3	14	-
TUH#168	56	M	M2	1	37	PLZF-RARA
TUH#93	65	F	M1	2	90	-
TUH#69	63	M	-	3	52	-
TUH#35	55	F	M4	1	14	KMT2D
TUH#83	51	F	M4	2	29	MYC
TUH#160	66	M	2ndR_SMP	3	64	CSMD1, NF1
TUH#84	69	M	M5	1	33	-
TUH#167	67	F	M1	-	85	-
TUH#169	56	M	M1	3	88	-

Tableau 7. Caractéristiques des patients incluant l'âge, le sexe, la classification franco-américaine-britannique (FAB) de la LAM, la classification de risque européenne LeukemiaNet (ELN) (profils favorables (1), intermédiaires (2) ou défavorables (3)) et les anomalies cytogénétiques connues. Blasts (%) : pourcentage de blasts périphériques avant séparation des cellules mononuclées ; 2ndR_SMP/SMD : LAM secondaire à un syndrome myélodysplasique (SMD) ou un syndrome myéloprolifératif (SMP).

1.2.2 Mesure des paramètres de la consommation d'oxygène des blastes de patients atteints de LAM

La mesure de la consommation d'oxygène basale (Basal OCR) des blastes de patients atteints de LAM se caractérise par une valeur minimale de $13,56 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$, une valeur maximale de $326,53 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ et une moyenne de $76,91 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ (Figure 17 – A).

La mesure de la consommation d'oxygène dépendante de la production d'ATP (ATP-turnover) montre une valeur minimale de $5,43 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$; une valeur maximale de $222,65 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ et une valeur moyenne de $48,45 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ (Figure 17 – B).

La mesure de la consommation d'oxygène liée à la fuite de protons (Proton leak) révèle une valeur minimale de $0,71 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$; une valeur maximale de $55,26 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ et une valeur moyenne de $11,57 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ (Figure 17 – C).

La mesure de la consommation d'oxygène maximale (Maximal OCR) montre une valeur minimale de $30,06 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$; une valeur maximale de $951,49 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ et une valeur moyenne de $194,0 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ (Figure 17 – D).

La mesure de la capacité de réserve respiratoire (SRC) révèle une valeur minimale de $11,27 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$; une valeur maximale de $680,61 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ et une valeur moyenne de $117,0 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ (Figure 17 – E).

La mesure de la consommation d'oxygène non-mitochondriale (Non-mt) montre une valeur minimale de $0,98 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$; une valeur maximale de $81,69 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ et une valeur moyenne de $16,90 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ (Figure 17 – F).

L'évaluation des différents paramètres liés à la consommation d'oxygène (Basal OCR, ATP-turnover, Proton leak, Maximal OCR, SRC, Non-mt) des blastes de patients atteints de LAM met en évidence des valeurs très variées traduisant une hétérogénéité du métabolisme énergétique.

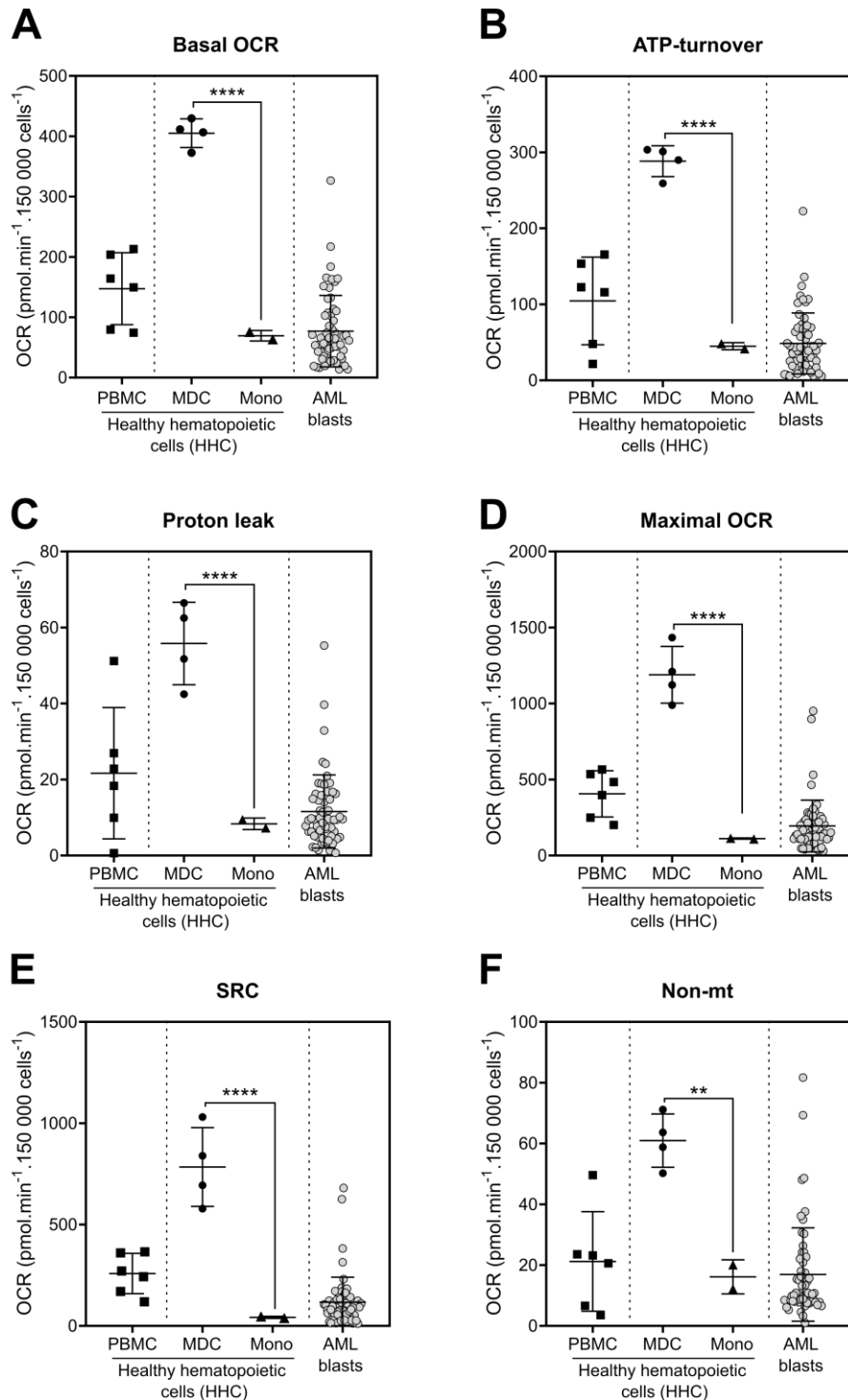


Figure 17. Evaluation des paramètres de la consommation d'oxygène des blastes de patients atteints de LAM (n=58 patients ; cf tableau 7) et de cellules hématopoïétiques de témoins sains. A l'issue de leur isolation, les cellules (blastes ou HHC) ont été mises en culture en présence des cytokines pour une durée de 18h. HHC : Cellules hématopoïétiques saines ; MDC : Cellules dendritiques dérivées de monocytes ; PBMC : cellules sanguines mononucléées périphériques ; Mono : Monocytes ; Non-mt : respiration non-mitochondriale ; OCR : oxygen consumption rate (n > 3 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001 ; ****p < 0,0001).

1.3 Mesure de deux paramètres reliés à la glycolyse sur des cellules hématopoïétiques saines

La technologie XFe Seahorse permet la mesure simultanée de la quantité d'oxygène dissous et de l'acidification du milieu extracellulaire (en $\text{mpH}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\ 000\ \text{cellules}^{-1}$). Nous avons donc mesuré l'acidification extracellulaire (ECAR) qui est proportionnelle à la glycolyse (207). Nous avons ainsi pu évaluer deux composantes de la glycolyse : l'activité glycolytique basale (ECAR Basal) où le métabolisme oxydatif mitochondrial est fonctionnel et l'activité glycolytique maximale après inhibition de la synthèse d'ATP mitochondriale suite à l'injection d'oligomycine A (ECAR Maximal).

1.3.1 Mesure de deux paramètres reliés à la glycolyse sur PBMC

La mesure de l'ECAR basal des cellules sanguines mononucléées périphériques (PBMC) montre que ces cellules ont une acidification extracellulaire basale (ECAR Basal) moyenne de $32,02\ \text{mpH}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\ 000\ \text{cellules}^{-1}$ (Figure 18 – A) et une acidification extracellulaire maximale (ECAR Maximal) de $38,82\ \text{mpH}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\ 000\ \text{cellules}^{-1}$ (Figure 18 – B).

1.3.2 Mesure de deux paramètres reliés à la glycolyse sur deux modèles myéloïdes

La mesure de l'ECAR Basal montre que les MDC ont une acidification extracellulaire moyenne de $62,06\ \text{mpH}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\ 000\ \text{cellules}^{-1}$ qui est significativement supérieure à celle des monocytes qui est de $12,81\ \text{mpH}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\ 000\ \text{cellules}^{-1}$ (Figure 18 – A).

La mesure de l'ECAR Maximal montre que MDC ont une acidification extracellulaire moyenne de $88,83\ \text{mpH}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\ 000\ \text{cellules}^{-1}$ qui est significativement supérieure à celle des monocytes qui est de $11,20\ \text{mpH}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\ 000\ \text{cellules}^{-1}$ (Figure 18 – B).

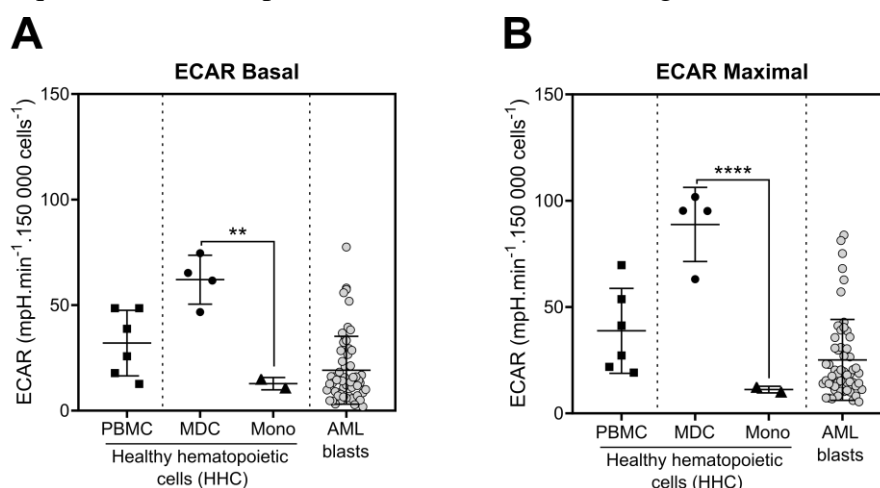


Figure 18. Evaluation des paramètres de l'activité glycolytique des blastes de patients atteints de LAM (n=58 patients ; cf tableau 7) et de cellules hématopoïétiques de témoins sains. A – Mesure de l'acidification extracellulaire basale (ECAR Basal). B – Mesure de l'acidification extracellulaire après injection d'oligomycine (ECAR Maximal). A l'issue de leur isolation, les cellules (blastes ou HHC) ont été mises en culture en présence des cytokines

pour une durée de 18h. HHC : Cellules hématopoïétiques saines ; MDC : Cellules dendritiques dérivées de monocytes ; PBMC : cellules sanguines mononucléées périphériques ; Mono : Monocytes ; ECAR : extracellular acidification rate. (n> 3 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 ; ****p<0,0001).

L'évaluation des paramètres reliés à la glycolyse (ECAR Basal et ECAR Maximal) des cellules hématopoïétiques mononucléées montrent qu'elles n'ont pas toutes le même métabolisme glycolytique. Plus particulièrement au niveau myéloïde, la comparaison entre les valeurs d'acidification extracellulaire des monocytes et des MDC montre que les MDC ont un métabolisme glycolytique plus important que celui des monocytes. Ces résultats mettent donc en évidence l'existence de différents phénotypes glycolytiques chez les cellules saines myéloïdes.

1.4 Mesure de deux paramètres reliés à la glycolyse sur des blastes de patients atteints de LAM

La mesure de l'acidification extracellulaire basale (ECAR Basal) des blastes de patients atteints de LAM se caractérise par une valeur minimale de 1,88 mpH.min⁻¹.150 000 cellules⁻¹, une valeur maximale de 77,5 mpH.min⁻¹.150 000 cellules⁻¹ et une moyenne de 19,12 mpH.min⁻¹.150 000 cellules⁻¹ (Figure 18 – A).

La mesure de l'acidification extracellulaire maximale (ECAR Maximal) montre une valeur minimale de 5,43 mpH.min⁻¹.150 000 cellules⁻¹ ; une valeur maximale de 83,88 mpH.min⁻¹.150 000 cellules⁻¹ et une valeur moyenne de 25,14 mpH.min⁻¹.150 000 cellules⁻¹ (Figure 18 – B).

L'évaluation des différents paramètres reliés à la glycolyse (ECAR Basal et ECAR Maximal) des blastes de patients atteints de LAM met en évidence des valeurs très variées traduisant une hétérogénéité du métabolisme glycolytique.

2. Analyses statistiques pour évaluer un lien potentiel entre la consommation d'oxygène ou de l'activité glycolytique des blastes et la survie des patients

2.1 Analyse de chaque composante en tant que variable numérique

A partir des résultats précédents, nous avons obtenus différents paramètres du phénotype métabolique des cellules isolées des patients atteints de LAM : OCR Basal, ATP Turnover, Proton Leak, OCR Maximal, Spare Respiratory Capacity (SRC), OCR non mitochondrial, ECAR Basal et ECAR Maximal (Figure 17 et Figure 18). Nous avons alors cherché à identifier quels paramètres étaient les plus liés à la survie des patients (Tableau 8). Nous

avons également inclus dans ces analyses deux autres paramètres qui sont l'âge des patients et le pourcentage de blastes périphériques au moment du prélèvement.

Deux analyses statistiques pour le calcul du Hazard Ratio ont été réalisées :

(1) en prenant en compte uniquement les patients présentant un taux de blastes circulants supérieur à 30% (n=41) (Tableau 8). En effet, nos analyses démontrent que lorsque le taux de blastes circulants est supérieur à 30%, les blastes représentent alors la population majoritaire dans les échantillons analysés par Seahorse après élimination des cellules polynucléées (essentiellement les polynucléaires neutrophiles)

(2) incluant tous les patients quel que soit leur taux de blastes circulants (n=58) (résultats présentés en Annexe 3)

Parameter	Pr > Chi ²	Hazard ratio	95% Hazard Ratio Confidence Limits	
Age	0.0072	1.054	1.014	1.094
Pourcentage de blastes	0.7458	1.004	0.982	1.026
Basal OCR	0.2431	0.994	0.983	1.004
ATP turnover	0.1990	0.989	0.974	1.006
Proton leak	0.53	0.981	0.924	1.041
Maximal OCR	0.1465	0.996	0.990	1.001
OCR Non-mt	0.4257	0.984	0.946	1.024
SRC	0.1546	0.994	0.986	1.002
ECAR Basal	0.5176	0.991	0.96	1.019
ECAR Maximal	0.5082	0.991	0.967	1.017

Tableau 8. Identification des facteurs liés à la survie après détermination du Hazard ratio (patients n=41).

Pour la variable "Age", la valeur de Pr>Chi² est très significative avec p = 0,0072. Comme attendu, l'âge est significativement lié à la survie des patients (208). La valeur du Hazard Ratio (HR) permet de quantifier si cette association est "protectrice" (HR<1) ou délétère (HR>1). Pour l'âge, la valeur du Hazard Ratio est de HR=1,054. Cela signifie que lorsque l'âge du patient augmente d'une année supplémentaire, la probabilité de décès dû à la maladie augmente de 5.4%.

Pour la variable "pourcentage de blastes", la valeur de Pr>Chi² est de p = 0,74. Il n'y a donc pas de corrélation entre le pourcentage de blastes dans nos échantillons et la survie des patients.

Parmi l'ensemble des paramètres métaboliques mesurés, "Maximal OCR" et "SRC" sont les deux variables les plus corrélées à la survie ($p = 0,1465$ et $p = 0,1546$). L'association la plus forte est observée avec la variable "SRC" ($HR = 0,994$). Cette valeur suggère que plus la SRC est élevée, plus le risque de décès du patient est faible.

Une analyse statistique supplémentaire (Annexe 3) a été réalisée en incluant tous les patients de l'étude. Cette analyse inclut les 58 patients atteints de LAM quel que soit le pourcentage de blastes circulants mesuré au moment du prélèvement. Dans cette analyse supplémentaire, on constate que la SRC est encore le paramètre présentant la plus forte corrélation avec la survie des patients ($HR = 0,994$; $p = 0,0398$). La suite de l'étude statistique a donc été réalisée sur la variable "SRC".

2.2 Analyse par procédure de discrétisation : établir un seuil pour transformer la variable numérique "SRC" en variable binaire

Nous avons recherché pour la variable numérique "SRC", un seuil permettant de créer deux groupes de patients dont les différences en termes de survie seront les plus fortes. Cela consiste à transformer la variable numérique "SRC" en variable binaire afin de maximiser les valeurs de Hazard Ratio. Le modèle de Cox a été utilisé pour estimer les valeurs de Hazard Ratio et la probabilité pour les patients présentant un taux de blastes périphériques supérieur à 30%.

Nous avons établi différents seuils pour la SRC allant de $20 \text{ pmol d'O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ à $180 \text{ pmol d'O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ (analyse effectuée par pas de 1). Cela permet de générer systématiquement deux groupes de patients dont les valeurs de SRC sont situées au-dessous ou au-dessus du seuil déterminé. La probabilité d'être liée à la survie et le Hazard Ratio ont été calculés et présentés sous forme de graphique (Figure 19 et Figure 20).

La significativité de l'association entre la SRC et la survie est la plus forte pour la valeur seuil de $75 \text{ pmol d'O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ ($p = 0,019$). Pour ce seuil, la valeur de Hazard Ratio est de $0,3556$ (Figure 20).

Une analyse statistique supplémentaire (Annexe 3) a été réalisée en incluant la totalité des 58 patients de l'étude (quel que soit le pourcentage de blastes circulants). Les résultats présentés en annexe 3 montrent que dans cette cohorte élargie, on observe aussi un seuil de $75 \text{ pmol d'O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ avec $p = 0,01782$ et $HR = 0,3778$.

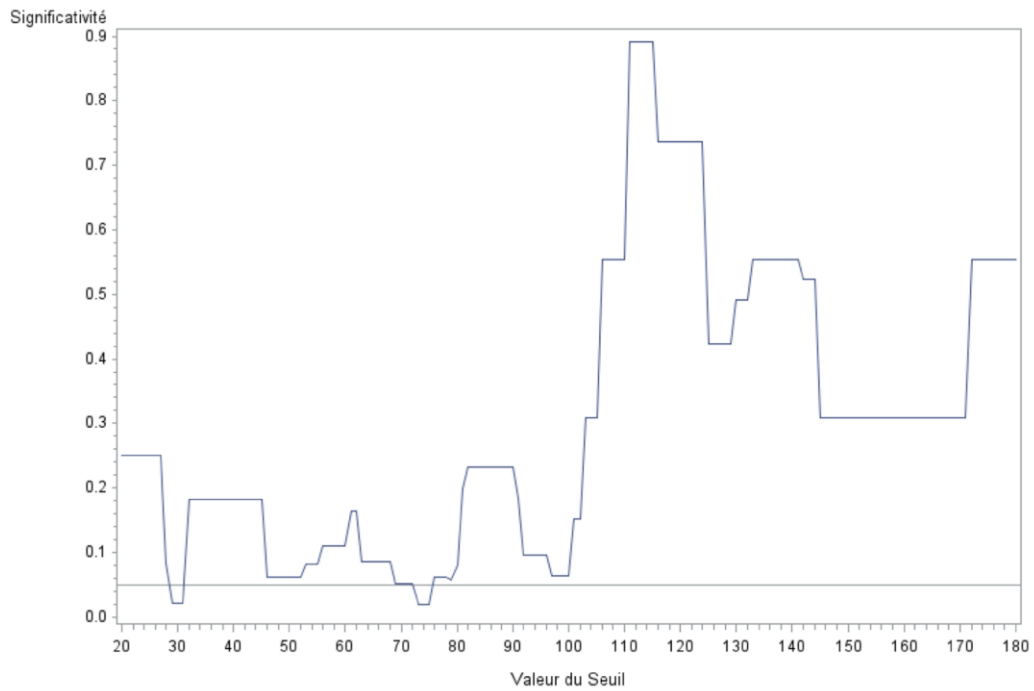


Figure 19. Valeur de la significativité de l'analyse statistique de lien entre la "SRC" et la survie des patients atteints de LAM. La significativité est exprimée en fonction de la valeur de chaque seuil SRC utilisé (nombre de patients = 41).

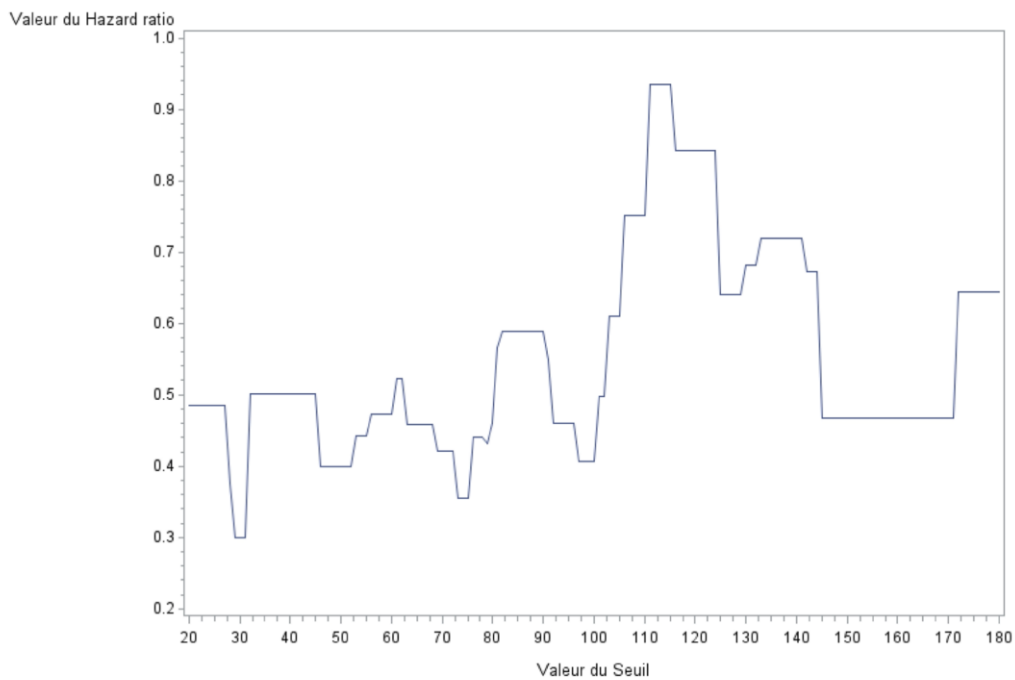


Figure 20. Valeur du Hazard ratio entre la "SRC" et la survie des patients atteints de LAM. Le Hazard ratio est exprimé en fonction de la valeur de chaque seuil SRC utilisé (nombre de patients = 41).

Pour la suite de l'étude, les patients caractérisés par des blastes dont la SRC est inférieure à $75 \text{ pmol d'O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ correspondront au groupe « low SRC ». Réciproquement, les patients caractérisés par des blastes dont la SRC est supérieure à $75 \text{ pmol d'O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ correspondront au groupe « high SRC ».

2.3 Courbes de survie des patients des groupes « high SRC » et « low SRC »

2.3.1 Sans censure à la greffe

Des courbes de survie ont alors été réalisées à l'aide d'un modèle de Cox pour les patients des groupes « high SRC » et « low SRC ». Nos résultats montrent que les patients du groupe « high SRC » ont une survie significativement plus longue que les patients du groupe « low SRC » ($p = 0,037$). Dans cette analyse, la survie des patients est prise en compte même s'ils ont bénéficié d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques (Figure 21).

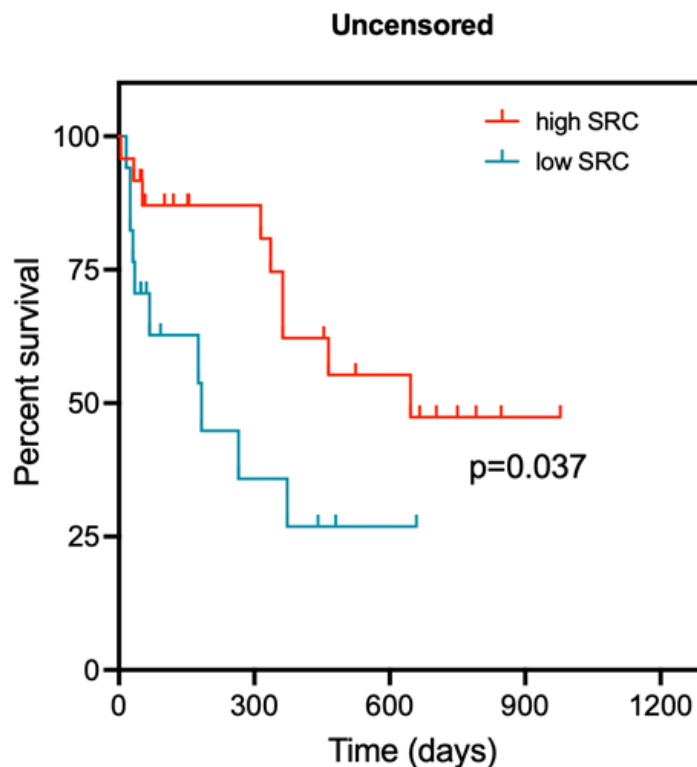


Figure 21. Survie globale des patients high et low SRC (analyse non censurée à la greffe de CSH). Les résultats présentés sont exprimés en pourcentage de survie (n= 41 patients ; n=25 high SRC ; n=16 low SRC).

2.3.2 Après censure à la greffe

Cette analyse a été répétée en prenant en compte l'impact de la greffe sur la survie des patients (analyse censurée à la greffe). Des courbes de survie ont donc été réalisées à l'aide d'un modèle de Cox pour les patients des groupes « high SRC » et « low SRC » avec censure du suivi de la survie des patients après avoir reçu une greffe de CSH. On observe toujours une différence de survie entre les deux groupes avec $p = 0,0029$ (Figure 22).

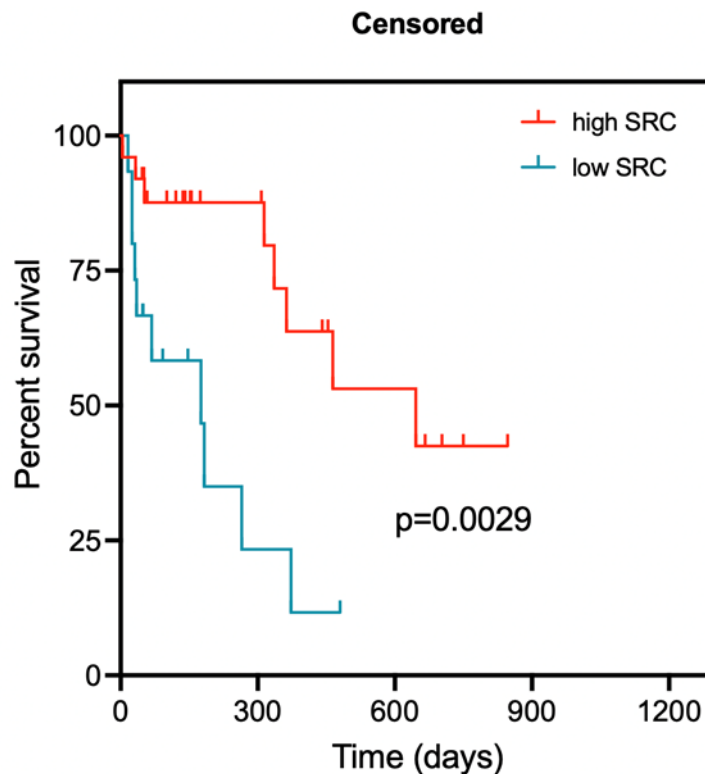


Figure 22. Survie globale des patients high et low SRC après censure post-greffe. Les résultats présentés sont exprimés en pourcentage de survie. (n= 41 patients; n=25 high SRC ; n=16 low SRC).

2.4 Analyse multivariée en prenant en compte l'influence de l'âge des patients sur la relation entre la SRC et la survie.

Nous avons vu que dans les LAM, la survie était aussi liée à l'âge (Tableau 8). Ainsi, plus les patients sont âgés, plus les risques de décès lié à la LAM sont importants. Cependant, Desler *et al.* ont montré dans différents tissus (cerveau, cœur et muscles squelettiques) que le déclin de la phosphorylation oxydative lié à l'âge était accompagné par une diminution de la SRC (209). Il est donc nécessaire de réaliser une analyse multivariée pour déterminer si la variable "âge des patients" pourrait influencer la corrélation entre la variable SRC et la survie.

Nous avons donc eu recours à la même procédure de discrétisation pour la variable "Age". Nous avons retenu le seuil de 60 ans pour lequel la significativité de l'association est de $p=0,01842$ et avec un Hazard Ratio de 11,24. Cela signifie que pour les patients âgés de plus de 60 ans atteints de LAM, le risque de décès est 11 fois plus élevé.

Nous avons donc déterminé si les variables "Age" et "SRC" étaient indépendantes ou liées en réalisant une analyse multivariée. Les probabilités d'associations et les Hazard Ratio entre la variable "Age" (> 60) ou la variable "SRC" (<75) et la survie des patients sont présentées dans le Tableau 9. Les résultats de l'analyse multivariée mettent en évidence une valeur $Pr > Chi^2$ qui est inférieure à 0,05 à la fois pour la variable "Age" et "SRC". **Ces variables peuvent donc être considérées comme indépendantes l'une de l'autre vis-à-vis de la survie.**

<i>Hazard ratios en Univarié</i>				
Parameter	Pr > Chi²	Hazard Ratio	95% Hazard Ratio Confidence Limits	
Age > 60	0.006	7.773	1.810	33.552
SRC < 75	0.0195	2.812	1.181	6.692
<i>Hazard ratios en Multivarié</i>				
Parameter	Pr > Chi²	Hazard Ratio	95% Hazard Ratio Confidence Limits	
Age > 60	0.0057	7.982	1.828	34.86
SRC < 75	0.0202	2.896	1.18	7.105

Tableau 9. Résultats des analyses uni variées et multivariées sur les variables « Age » et « SRC ». (n= 41 patients; n=25 high SRC ; n=16 low SRC).

3. Caractérisation des différences métaboliques et moléculaires entre les blastes des patients des groupes « high SRC » et « low SRC »

3.1 Analyse comparative de la consommation d'oxygène des blastes de patients high SRC et low SRC

Nos résultats montrent que les blastes de patients high SRC ont une valeur médiane de consommation d'oxygène basale (Basal OCR) plus importante que les blastes de patients low SRC (de 68,8 contre 34,2 $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000\text{ cellules}^{-1}$) (Figure 23 – A). Il en va de même pour la consommation d'oxygène dépendante de la production d'ATP (ATP-turnover) (44,8 contre 18,5 $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000\text{ cellules}^{-1}$) (Figure 23 – B) ; pour la fuite de protons (Proton leak) (10,2 contre 6,4 $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000\text{ cellules}^{-1}$) (Figure 23 – C) ; pour la consommation d'oxygène maximale (Maximal OCR) (199,3 contre 78,6 $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000\text{ cellules}^{-1}$) (Figure 23 – D) (Figure 23 – E). **Les blastes de patients low SRC présentent donc par rapport aux blastes de patients high SRC, une réduction significative de leur métabolisme mitochondrial oxydatif.**

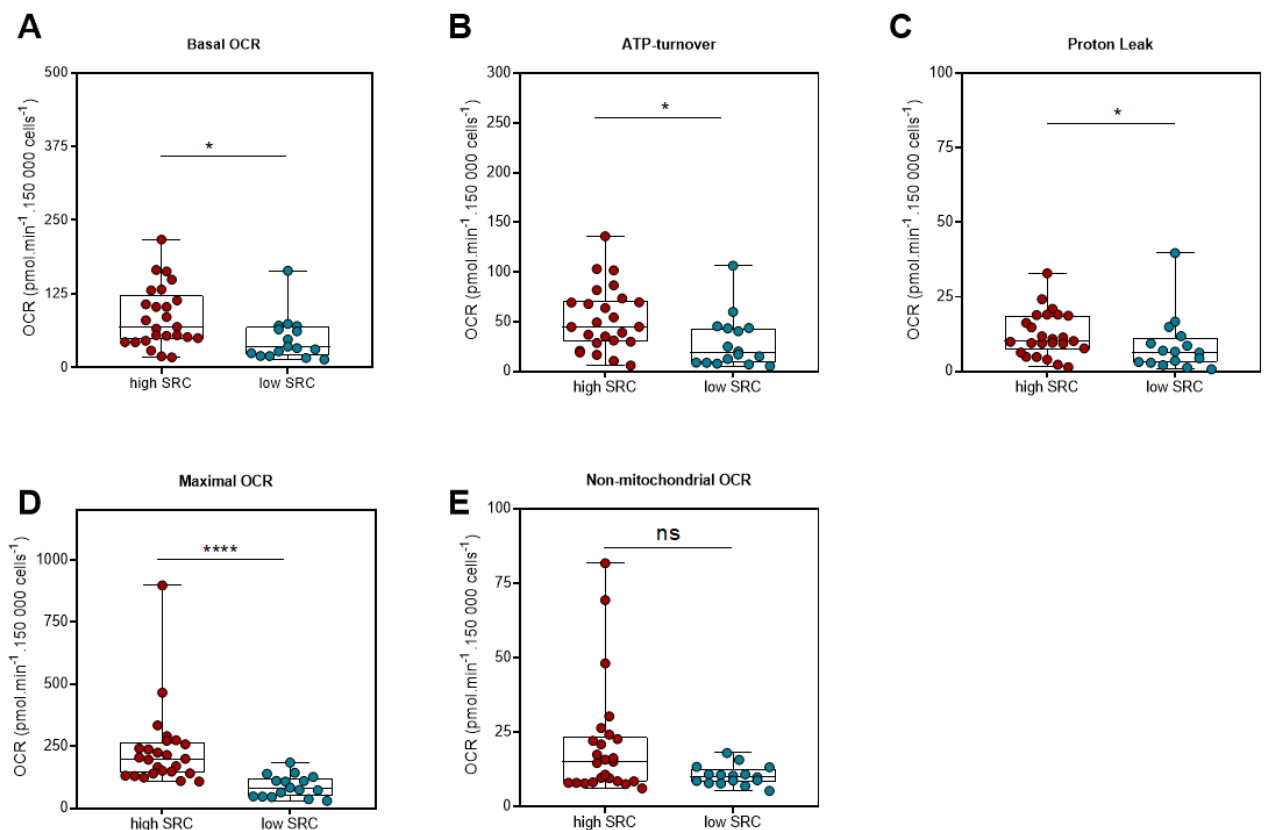


Figure 23. Comparaison des composantes de la consommation d'oxygène des blastes entre le groupe de patients high SRC et low SRC. OCR : Oxygen consumption rate ($n > 3$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). ($n = 41$ patients; $n = 25$ high SRC; $n = 16$ low SRC).**

3.2 Analyse comparative de l'activité glycolytique des blastes de patients high SRC et low SRC

L'activité glycolytique des blastes de patients high SRC est supérieure à celle des blastes des patients low SRC aussi bien dans un état basal (ECAR Basal) (valeur médiane de 16,1 contre 9,2 mpH.min⁻¹.150 000 cellules⁻¹) (Figure 24 – A) que dans un état où la synthèse d'ATP mitochondriale est inhibée (ECAR Max) (valeur médiane de 23,1 contre 14,35 mpH.min⁻¹.150 000 cellules⁻¹) (Figure 24 – B).

Nos résultats montrent un métabolisme glycolytique plus faible dans les blastes de patients low SRC par rapport aux blastes de patients high SRC. De manière surprenante, dans les blastes de patients low SRC, il n'y a donc pas de compensation du faible métabolisme mitochondrial par une augmentation de l'activité glycolytique. La caractérisation du métabolisme mitochondrial et glycolytique met ainsi en évidence un hypométabolisme énergétique dans les blastes de patients low SRC.

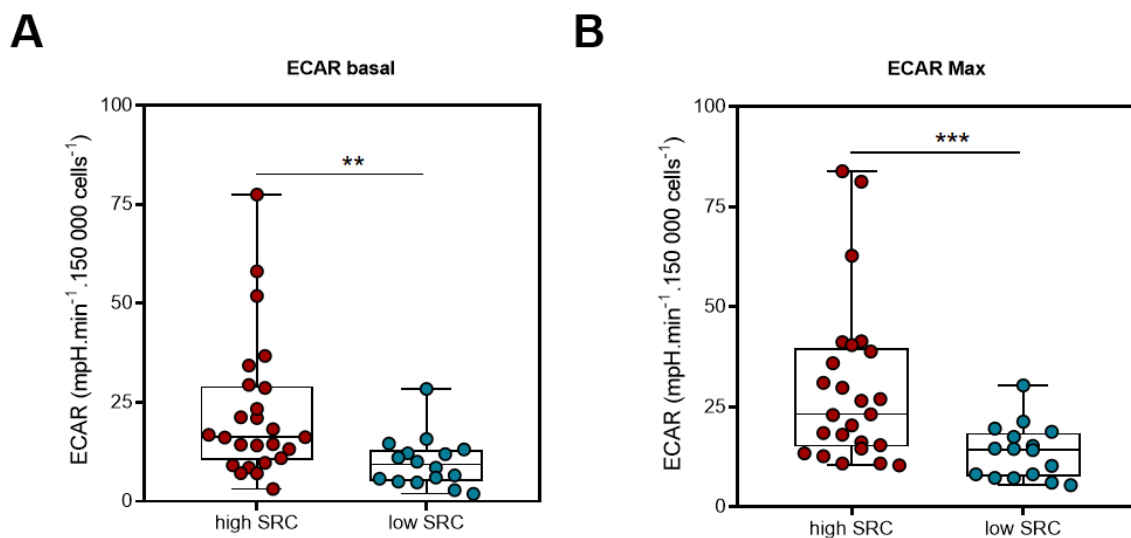


Figure 24. Comparaison de la capacité glycolytique des blastes entre le groupe de patients high SRC et low SRC. A - Mesure de l'acidification extracellulaire (ECAR basal) dans un état basal en absence d'inhibiteur. B - Mesure de l'acidification extracellulaire maximale (ECAR Max) après injection d'oligomycine A. (n>3 ; *p<0,001 ; ****p<0,0001). (n= 41 patients; n=25 high SRC ; n=16 low SRC).**

3.3 Caractérisation des anomalies moléculaires entre les blastes des patients « high SRC » et « low SRC ».

Afin de déterminer s'il existe des mutations spécifiques associées au phénotype métabolique high ou low SRC, nous avons séquencé par NGS un panel de 40 gènes regroupant des gènes

Gene	Gene status	high SRC	low SRC	Total	Fisher's exact test (p)
NMP1	Mutated	10	8	18	0,743
	Wild-type	12	7	19	
DNMT3A	Mutated	8	5	18	>0,99
	Wild-type	14	10	36	
FLT3-ITD	Mutated	6	5	11	0,712
	Wild-type	17	10	27	
FLT3-TKD	Mutated	7	3	10	0,708
	Wild-type	16	12	28	
NRAS	Mutated	6	2	8	0,681
	Wild-type	16	10	26	
IDH1	Mutated	1	3	4	0,286
	Wild-type	22	13	35	
IDH2	Mutated	1	6	7	0,011
	Wild-type	10	23	33	
TET2	Mutated	4	3	7	0,677
	Wild-type	18	9	27	
ASXL1	Mutated	1	2	3	0,554
	Wild-type	21	13	34	
TP53	Mutated	0	5	5	0,0028
	Wild-type	22	7	29	
RUNX1	Mutated	1	1	2	>0,99
	Wild-type	21	11	32	
SRSF2	Mutated	2	1	3	>0,99
	Wild-type	20	11	31	
WT1	Mutated	3	0	3	0,536
	Wild-type	19	12	31	
SMC1A	Mutated	2	2	4	1,536
	Wild-type	20	10	30	

Tableau 11. Résultats des analyses par test exact de Fisher menés sur les gènes mutés retrouvés au diagnostic chez les blastes de patients high et low SRC. (n= 41 patients; n=25 high SRC ; n=16 low SRC).

L'analyse des anomalies moléculaires met donc en évidence une présence plus importante des mutations IDH2 et TP53 dans le groupe de patients low SRC.

4. Contribution du pyruvate, des acides-gras et de la glutamine dans le fonctionnement basal de la chaîne respiratoire des blastes et lors de son accélération.

Nos résultats précédents ont montré que la valeur de la capacité de réserve respiratoire (SRC) était corrélée avec le pronostic de survie des patients. Cette mesure correspond à la capacité des blastes à accélérer leur chaîne respiratoire après une stimulation par le FCCP. Nous avons donc ensuite déterminé les substrats utilisés par les blastes lors du fonctionnement basal de la chaîne respiratoire et lors de son accélération induite par le FCCP. Tout d'abord, nous avons mesuré la consommation d'oxygène après avoir inhibé les voies métaboliques contribuant à l'anaplérose du cycle de Krebs.

4.1 Substrats oxydés lors du fonctionnement basal de la chaîne respiratoire dans les LAM

Pour moduler la disponibilité des principaux substrats oxydés dans le cycle de Krebs (pyruvate, acide gras et glutamine), nous avons inhibé leur utilisation pharmacologiquement. Les blastes de patients atteints de LAM ont ainsi été traités avec de l'UK5099 pour inhiber l'entrée de pyruvate par le MPC, avec de l'etomoxir pour inhiber CPT1 et du BPTES pour inhiber la GLS (Figure 25 – A). Pour cette expérience, nous avons choisi d'exposer à ces différents inhibiteurs des blastes de patients high SRC ($>75 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$). En effet, pour apprécier la contribution des voies métaboliques dans l'accélération de la chaîne respiratoire, il est nécessaire que les cellules puissent augmenter suffisamment leur consommation d'oxygène afin d'en observer les effets sur l'oxydation des substrats. Nos résultats montrent que chez les blastes issus des patients AML#58, AML#75 et AML#72, l'inhibition respective du MPC, de CPT1 ou de GLS n'entraîne pas de diminution de la consommation d'oxygène basale (Figure 25 – B).

4.2 Substrats oxydés au cours de l'accélération de la chaîne respiratoire dans les LAM

Dans des conditions où l'activité de la chaîne respiratoire est accélérée suite à l'exposition au FCCP, l'inhibition du métabolisme du pyruvate met en évidence une réduction de la consommation d'oxygène maximale. En effet, après traitement avec de l'UK5099 ($60\mu\text{M}$) les valeurs de consommation d'oxygène passent de $629,6$ à $288,4 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ pour le patient AML#58 ; $609,3$ à $323,2 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ pour le patient AML#75 et $335,4$ à $164,7 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ pour le patient AML#72.

L'inhibition du métabolisme des acides-gras en présence d'etomoxir ($5\mu\text{M}$) provoque une diminution de la consommation d'oxygène maximale, faisant passer les valeurs moyennes de consommation d'oxygène maximale de $629,6$ à $495,9 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ pour le

patient AML#58 ; 609,3 à 451,2 pmol.min⁻¹.150 000 cellules⁻¹ pour le patient AML#75 et 335,4 à 229,1 pmol.min⁻¹.150 000 cellules⁻¹ pour le patient AML#72.

L'inhibition du métabolisme de la glutamine, pour sa part, ne montre pas d'effet sur la consommation d'oxygène maximale, après l'inhibition de la GLS par le BPTES (Figure 25 – C).

Au niveau de la SRC, la consommation d'oxygène est fortement réduite en présence d'UK5099 ou modérément réduite en présence d'etomoxir tandis que les BPTES n'engendre pas de modification majeure (Figure 25 – D).

Sur la base de ces 3 trois échantillons de blastes de patients, ces résultats suggèrent que pour accélérer l'activité de leur chaîne respiratoire, les blastes avec une high SRC oxydent majoritairement du pyruvate et à moindre mesure des acides-gras.

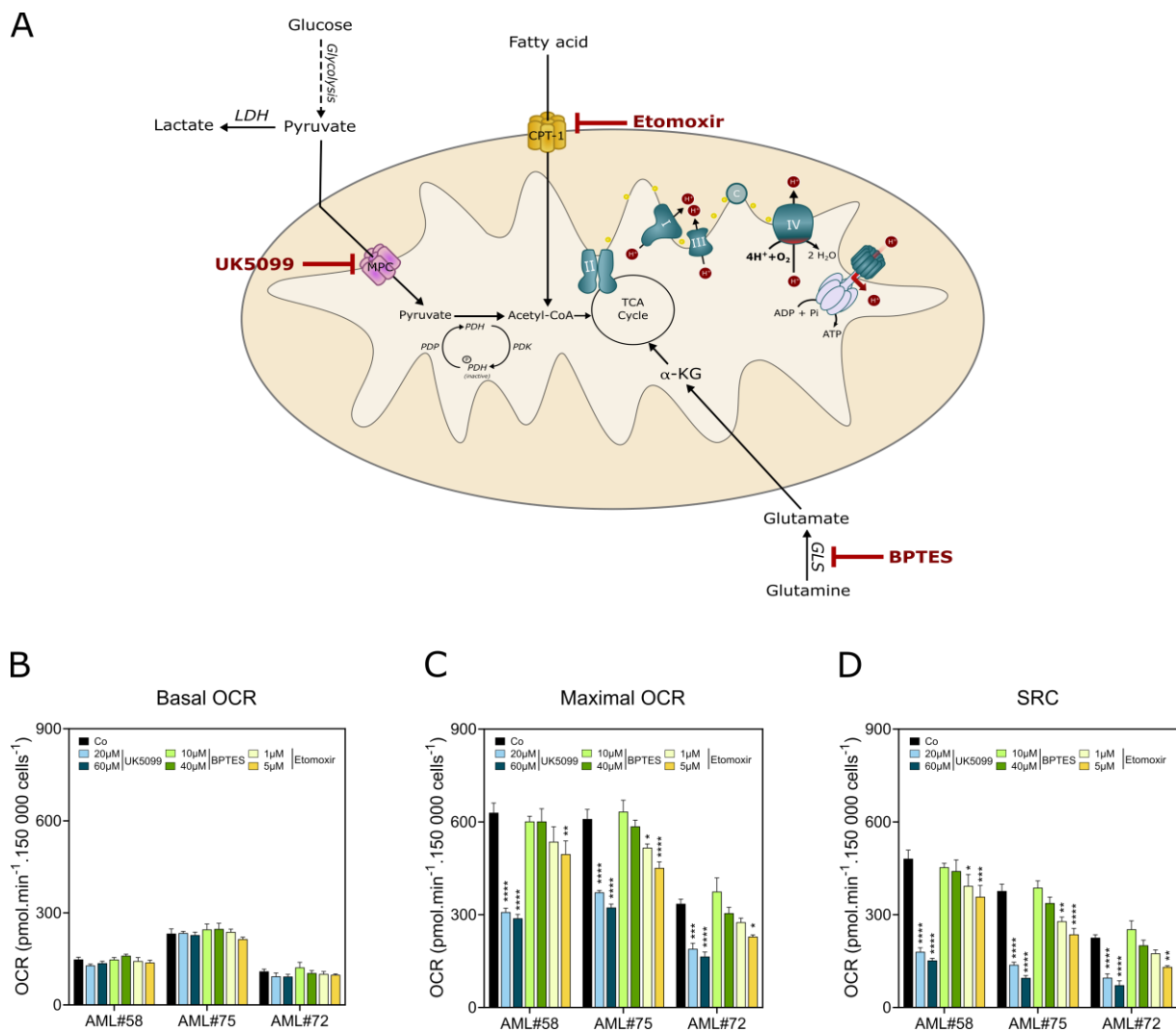


Figure 25. Détermination des substrats oxydés lors de l'augmentation de l'activité de la chaîne respiratoire dans les LAM. A - Représentation des cibles et des inhibiteurs utilisés. B – Histogramme représentant la consommation d'oxygène basale (Basal OCR) des blastes

issus des patients AML#58, AML#75 et AML#72 après 30 minutes de traitement avec différents inhibiteurs pharmacologiques précédent le début de la mesure de la consommation d'oxygène. C - Histogramme représentant la consommation d'oxygène maximale (Maximal OCR). D - Histogramme représentant la capacité de réserve respiratoire (SRC). (moyenne +/- SEM; n> 3; *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 ; ****p<0,0001).

4.3 Conséquence de la modulation du métabolisme du pyruvate sur l'OCR basale et l'OCR maximale de la chaîne respiratoire des blastes des patients « high SRC » et « low SRC ».

Nous avons montré que dans des blastes high SRC, l'inhibition de l'entrée du pyruvate permettait de diminuer la SRC. Nous avons donc ensuite déterminé si les blastes low SRC présentaient cette même caractéristique.

Nous avons d'une part vérifié le fait que l'inhibition de l'entrée du pyruvate entraînait une diminution de la SRC sur trois autres patients avec un profil high SRC (>75 pmol d'O₂.min⁻¹.150 000 cellules⁻¹) et d'autre part nous avons mesuré l'impact de cette inhibition sur 4 patients avec un profil low SRC (<75 pmol d'O₂.min⁻¹.150 000 cellules⁻¹). Nos résultats mettent en évidence qu'après traitement avec l'UK5099 à dose croissante, ni la consommation d'oxygène basale des blastes de patients high SRC (AML#44, AML#31, AML#50) ni celle des blastes de patients low SRC (AML#39, AML#49, AML#45, AML#48) n'est modifiée (Figure 26 – A).

Nous avons ensuite mesuré la consommation d'oxygène de blastes de patients high SRC et low SRC exposés à des doses croissantes d'UK5099 et traités avec du FCCP afin d'accélérer la chaîne respiratoire. Nos résultats montrent que dans ces conditions la consommation d'oxygène maximale diminue de manière significative pour tous les blastes de patients high SRC tandis qu'elle n'est réduite que pour la moitié des blastes de patients low SRC (AML#49 et AML#45) (Figure 26 – B). L'évaluation de la SRC montre quant à elle qu'en présence d'UK5099, l'ensemble des blastes de patients high SRC voit leur capacité de réserve respiratoire significativement amoindrie. Les blastes de patients low SRC montrent quant à eux une diminution de la SRC pour les patients AML#39, AML#49 et AML#45. Seuls les blastes du patient low SRC AML#48 ne présentent pas de réduction significative de leur SRC lors de l'inhibition du MPC (Figure 26 – C).

L'entrée du pyruvate participe donc à l'accélération de la chaîne respiratoire à la fois chez les blastes de patients high SRC et low SRC.

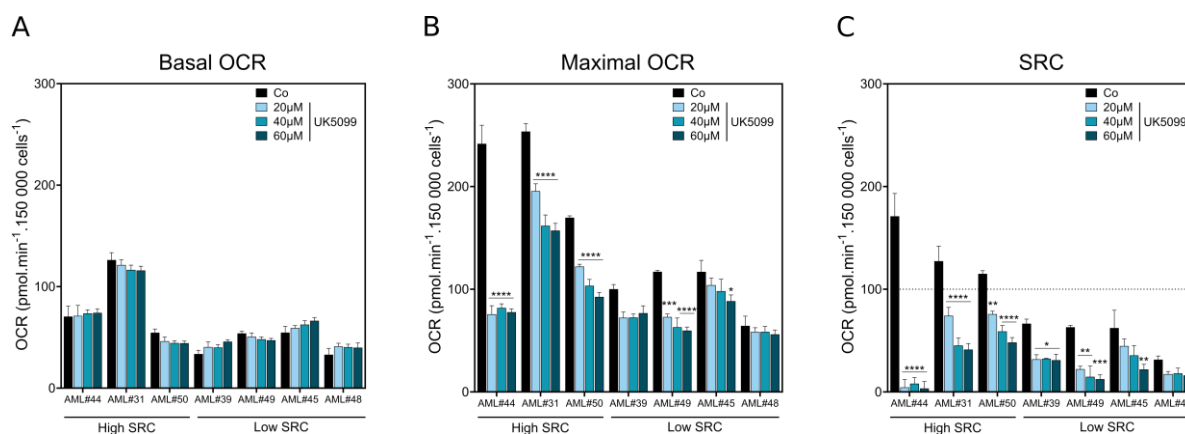


Figure 26. Effet de l'UK5099 sur l'activité de la chaîne respiratoire des blastes issus de patient. A – Histogramme représentant la consommation d'oxygène basale des blastes de 3 patients high SRC et 4 patients low SRC exposés à différentes concentrations d'UK5099. B – Histogramme représentant la consommation d'oxygène maximale. C - Histogramme représentant la capacité de réserve respiratoire (SRC). (moyenne +/- SEM; n> 3; *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 ; ****p<0,0001).

5. Détermination des voies métaboliques impliquées dans l'accélération de la chaîne respiratoire des blastes

La contribution du pyruvate a été jusqu'ici démontrée uniquement au travers de l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique. Pour confirmer les effets observés, nous avons utilisé des approches complémentaires.

5.1 Dépendance de l'entrée mitochondriale du pyruvate pour augmenter l'activité de la chaîne respiratoire

Tout d'abord, nous avons déterminé si tout comme les blastes issus de patients, les lignées cellulaires de LAM étaient dépendantes de l'utilisation du pyruvate pour augmenter l'activité de leur chaîne respiratoire après exposition au FCCP. Pour se faire, nous avons mesuré la SRC de 6 lignées cellulaires de LAM (HL-60, KG1, OCI-AML3, THP-1, U937, MOLM-13) après traitement avec de l'UK5099. **Nos résultats montrent qu'à 60μM d'UK5099, la SRC de l'ensemble des lignées testées est significativement diminuée** (Figure 27 - A).

5.1.1 Effet de l'exposition au méthyl-pyruvate sur l'activité de la chaîne respiratoire

Nous avons ensuite déterminé si l'augmentation de la disponibilité du pyruvate intracellulaire pouvait augmenter l'activité de la chaîne respiratoire. Pour mener à bien cette expérience nous avons eu recours à la lignée cellulaire MOLM-13 que nous avons traitée avec du méthyl-pyruvate (MP) qui diffuse librement dans la matrice mitochondriale (210). Nos résultats

montrent qu'en présence de MP, la consommation basale d'oxygène (Basal OCR) des MOLM-13 augmente significativement en passant de 186,85 à 236,40 65 pmol.min⁻¹.150 000 cellules⁻¹ (Fig X – B), suggérant une accélération de la chaîne respiratoire.

5.1.2 Effet de l'exposition au DCA sur l'activité de la chaîne respiratoire

Nous avons également traité les MOLM-13 avec du DCA qui est un inhibiteur de la PDK responsable de l'inhibition de l'activité de la PDH. Après exposition au DCA, la consommation basale d'oxygène des MOLM-13 s'élève à 272,02 65 pmol.min⁻¹.150 000 cellules⁻¹ suggérant une accélération de la chaîne respiratoire. Que ce soit en présence de MP ou de DCA, la consommation d'oxygène maximale (Maximal OCR) reste quant à elle inchangée (Figure 27 – B).

Ces résultats démontrent que dans la lignée cellulaire MOLM-13, l'augmentation de la disponibilité en pyruvate au niveau mitochondrial est suffisante pour accélérer l'activité de la chaîne respiratoire.

5.1.3 Effet de l'inhibition de l'expression du MPC2 sur l'activité de la chaîne respiratoire

Pour vérifier nos résultats, nous avons réduit au silence l'expression de MPC2 (protéine impliquée dans l'import mitochondrial du pyruvate) par ARNsh. Nous avons ainsi généré, à partir de la lignée MOLM-13, des lignées « MPC2 knock-down » qui présentent une expression du MPC2 indétectable par western blot (lignée A5-3H) ou 5 fois plus faible que la lignée contrôle (C10-3H) (Figure 27 – C). Les lignées « MPC2 knock-down » présentent une réduction importante de leur SRC. En effet, la lignée MOLM-13 ayant été infectée avec une séquence contrôle a une SRC de 173,45 pmol d'O₂.min⁻¹.150 000 cellules⁻¹ tandis que celle de la lignée A5-3H est de 77,65 pmol d'O₂.min⁻¹.150 000 cellules⁻¹ et celle de la lignée C10-3H de 74,09 pmol d'O₂.min⁻¹.150 000 cellules⁻¹ (Figure 27 – D).

Ces résultats montrent donc que l'inhibition de l'expression du MPC2 engendre une chute de la SRC dans la lignée leucémique MOLM-13.

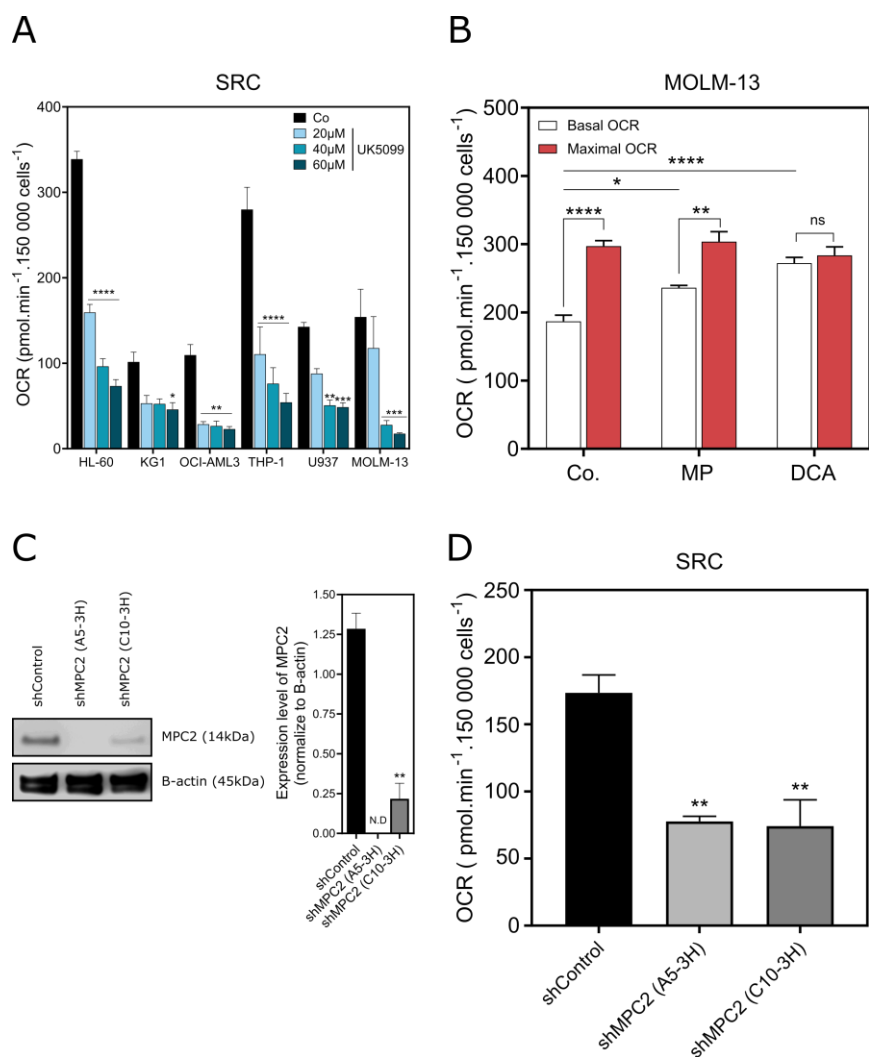


Figure 27. Détermination des substrats oxydés lors de l'augmentation de l'activité de la chaîne respiratoire dans les LAM. A – Histogramme représentant le niveau de SRC des lignées cellulaires de LAM HL-60, KG1, OCI-AML3, THP-1, U937 et MOLM-13 exposées à des doses croissantes d'UK5099 (20,40,60μM) pendant 30 minutes préalablement à la mesure de leur consommation d'oxygène. B – Histogramme représentant la consommation d'oxygène basale et maximale de MOLM-13 après un traitement de 30 minutes précédant le début de la mesure de la consommation d'oxygène avec du méthyl-pyruvate (MP) (10mM) et du DCA (10mM). C – Résultat de Western blot dirigé contre la B-actine (gène de ménage) et contre le MPC2. La lignée MOLM-13 est la lignée parentale à partir de laquelle les autres lignées sont issues. Les chiffres associés aux lentivirus ARNsh A et C correspondent aux MOI utilisés (5 ou 10) pour infecter les cellules. Le lentivirus sh-control correspond au lentivirus contenant un ARNsh ne ciblant aucune protéine. D – Histogramme représentant le niveau de SRC dans la lignée MOLM-13 infectée avec le ARNsh contrôle (shControl), dans la lignée clonale MOLM-13 shMPC2 (A5-3H) et dans la lignée clonale MOLM-13 shMPC2 (C10-3H). (moyenne +/- SEM; n> 3; *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 ; ****p<0,0001).

Nos résultats mettent en évidence que l'entrée mitochondriale du pyruvate est une étape essentielle pour l'accélération de l'activité de la chaîne respiratoire des lignées cellulaires de LAM et des blastes de LAM.

5.2 Etude des voies métaboliques mitochondriales impliquées dans l'accélération de la chaîne respiratoire

Puisque nous avons démontré que le pyruvate était le substrat majoritairement utilisé pour augmenter l'activité de la chaîne respiratoire, nous nous sommes interrogés sur les voies métaboliques empruntées par le pyruvate au cours du fonctionnement basal de la chaîne respiratoire et lors de son accélération induite par le FCCP.

Pour répondre à cette problématique nous avons eu recours à une approche de métabolomique où nous avons utilisé de l'[U¹³C]-Glucose qui est un isomère du glucose non radioactif et dont les six atomes de carbone ont une masse atomique de 13 u.m.a (¹³C).

5.2.1 Marquage au l'[U¹³C]-Glucose et accélération de la chaîne respiratoire

Pour marquer les cellules MOLM-13 avec de l'[U¹³C]-Glucose, nous avons centrifugé les cellules et nous les avons resuspendues dans un milieu contenant uniquement du glucose marqué. Immédiatement après ce changement de milieu nous avons mesuré la consommation d'oxygène à l'aide d'un Oroboros O₂K afin de vérifier que pour chaque réplica expérimental, les injections de FCCP induisent une augmentation de la consommation d'oxygène. Nous avons ainsi accéléré la chaîne respiratoire des MOLM-13 pendant 40 minutes puis nous avons récupéré les cellules afin d'en extraire les métabolites marqués (Figure 28).

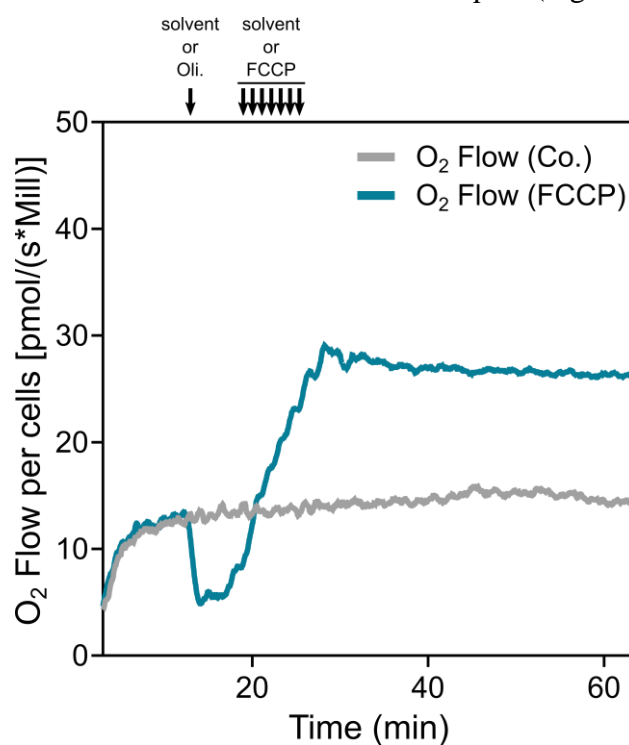


Figure 28. Courbe de consommation d'oxygène représentative des conditions expérimentales pour accélérer l'activité de la chaîne respiratoire des cellules de la lignée MOLM-13 en présence de FCCP. Oli. = Oligomycine A.

5.2.2 Etude des variations quantitatives de métabolites lors de l'accélération de la chaîne respiratoire

Par spectrométrie de masse, nous avons analysé les quantités de métabolites (analyse de l'ensemble des métabolites ^{12}C et ^{13}C). L'analyse des voies métaboliques (Pathway Impact) montre que l'augmentation de l'activité de la chaîne respiratoire est associée à une modification de la glycolyse, du métabolisme pyruvate et du cycle de Krebs, du métabolisme de la glycine/sérine/thréonine et du métabolisme de l'alanine/aspartate/glutamate (Figure 29 - A). L'analyse des quantités relatives de métabolites montre que lors de l'accélération de la chaîne respiratoire induite par le FCCP, les quantités de citrate, cis-aconitase, malate, fumarate, serine et aspartate diminuent de manière significative, tandis que la proline est le seul métabolite à augmenter (Figure 29 - B).

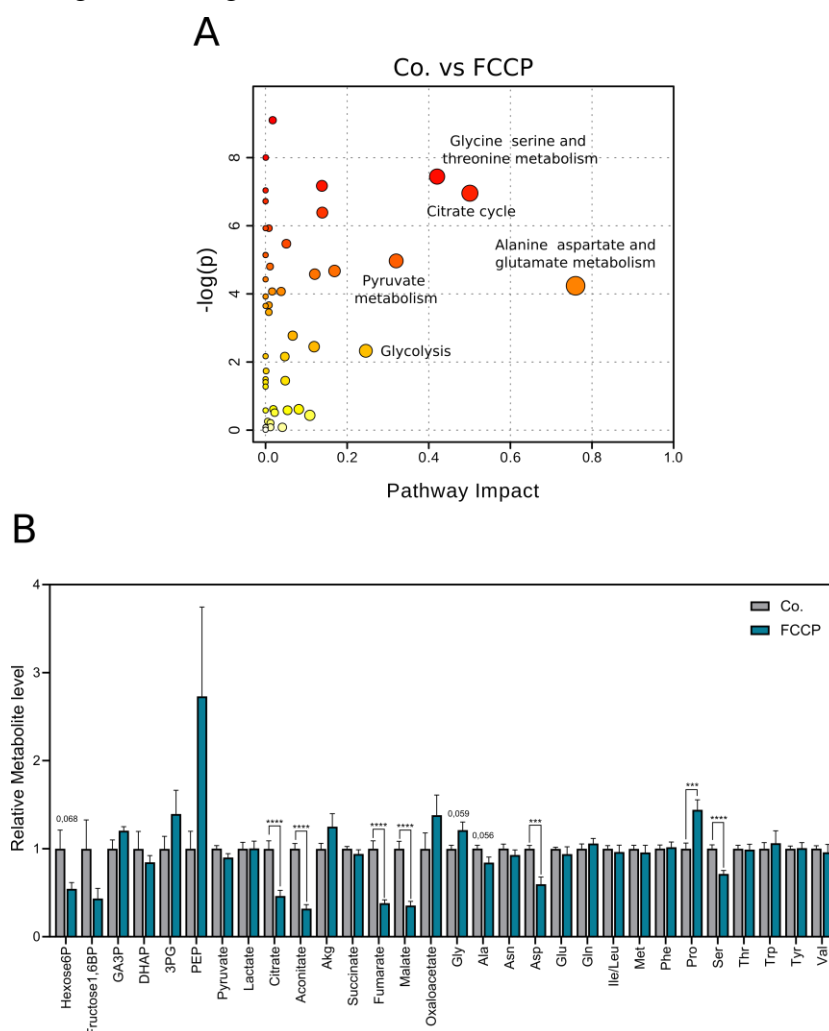


Figure 29. Variations des voies métaboliques et des quantités relatives de métabolites lors de l'accélération de la chaîne respiratoire. A - Représentation des variations dans les voies métaboliques lors de l'accélération de la chaîne respiratoire. B - Histogramme de la quantité relative en métabolite dans des conditions de consommation d'oxygène basale (Co.) ou lors de l'accélération de la chaîne respiratoire (FCCP). (moyenne +/- SD; n= 3; *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 ; ****p<0,0001).

Ces résultats démontrent que lors de l'accélération de la chaîne respiratoire, il y a un engagement de différentes voies métaboliques, et notamment du cycle de Krebs avec une diminution importante de la quantité relative de la plupart des métabolites impliqués dans cette voie.

Afin de déterminer plus spécifiquement par quelle voie métabolique, l'oxydation du glucose participait à l'accélération de l'activité de la chaîne respiratoire, nous avons analysé la répartition des atomes de l'[U13C]-Glucose dans les différentes voies métaboliques.

5.3 Etude des voies métaboliques mitochondriales impliquées dans l'anaplérose du cycle de Krebs

5.3.1 Etude des voies métaboliques mitochondriales empruntées par le pyruvate lors du fonctionnement basal de la chaîne respiratoire

Nous avons dans un premier temps analysé la contribution du pyruvate issu de la glycolyse dans le fonctionnement basal du cycle de Krebs (cellules MOLM-13 non traitées). Pour se faire, nous avons analysé la distribution des atomes de carbones marqués (isotope m+).

Le pyruvate peut rejoindre le cycle de Krebs par deux enzymes majeures : la pyruvate carboxylase (PC) qui introduit 3 carbones marqués dans le cycle (isotope m+3) ou la pyruvate déshydrogénase (PDH) qui introduit 2 carbones marqués dans le cycle (isotope m+2). Nos résultats montrent qu'en condition de consommation d'oxygène basale (Co.), différents métabolites du cycle de Krebs (citrate, cis-aconitate, a-cétoglutarate, fumarate et malate) présentent un marquage sur deux carbones (isotope m+2) (Figure 30).

L'observation d'un marquage plus important en m+2 qu'en m+3 pour les différents métabolites cités indique donc que l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs s'effectue majoritairement par l'intermédiaire de la PDH. Dans les MOLM-13, lors du fonctionnement basal de la chaîne respiratoire, l'oxydation du glucose participe donc à l'anaplérose du cycle de Krebs *via* la PDH.

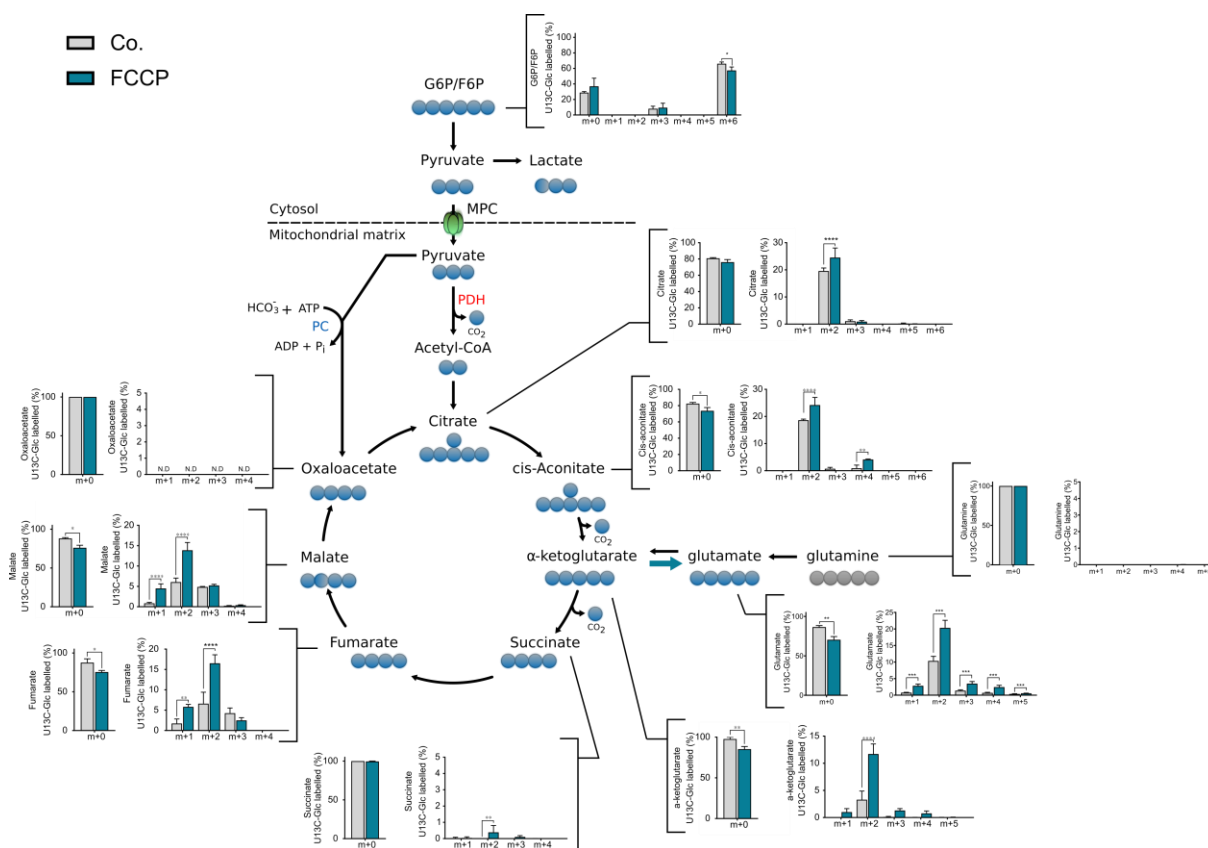


Figure 30. Représentation du flux métabolique emprunté par le [U13C]-Glucose dans une condition basale (Co.) ou dans une condition où l'activité de la chaîne respiratoire est accélérée en présence de FCCP. Les m+ correspondent au nombre de carbones marqués. PC : Pyruvate Carboxylase ; PDH : Pyruvate Déshydrogénase ; MPC : Mitochondrial Pyruvate Carrier. (moyenne +/- SD; n=3; *p<0,05 ; **p<0,01 ; *p<0,001 ; ****p<0,0001).**

5.3.2 Etude des voies métaboliques mitochondriales empruntées par le pyruvate suite à l'accélération de la chaîne respiratoire

Dans un second temps, nous avons déterminé la contribution du pyruvate issu de la glycolyse lors de l'accélération de la chaîne respiratoire induite par le FCCP. L'analyse des métabolites issus du glucose dans une condition où l'activité de la chaîne respiratoire est accélérée (FCCP) montre une augmentation du marquage en m+2 des différents intermédiaires du cycle de Krebs : citrate (passe de 19,5% à 24,4%), cis-aconitate (passe de 18,6% à 24,2%), a-cétoglutarate (passe de 3,3% à 11,7%), fumarate (passe de 6,6% à 16,5%) et malate (passe de 6% à 13,9%) (Figure 30).

Lors de l'accélération de la chaîne respiratoire, il y a donc, au niveau du cycle de Krebs, une augmentation de l'incorporation du pyruvate issu de la glycolyse qui est sous la dépendance de la PDH. Ce résultat confirme donc les résultats précédents montrant que

l'entrée mitochondriale du pyruvate est un phénomène essentiel dans l'augmentation de la consommation d'oxygène.

Pour les MOLM-13, que ce soit lors du fonctionnement basal ou lors de l'accélération de la chaîne respiratoire, l'incorporation du pyruvate dans le cycle de Krebs est médiée par la PDH.

En utilisant la même démarche méthodologique que pour notre analyse avec l'[U¹³C]-Glucose, nous avons analysé les voies métaboliques empruntées par l'[U¹³C]-Glutamine lors du fonctionnement basal de la chaîne respiratoire et lors de son accélération (Annexe 2 - Figure 33). **Nos résultats montrent que lors du fonctionnement basal de la chaîne respiratoire, la glutamine est incorporée au sein du cycle de Krebs mais que cette incorporation diminue lors de l'accélération de la chaîne respiratoire induite par le FCCP. Ce résultat est donc en accord avec les résultats précédents ayant montré que l'inhibition du métabolisme de la glutamine n'induisait pas de réduction significative de la SRC.**

5.4 Implication de la glycolyse dans l'accélération de la chaîne respiratoire

Nous avons ensuite déterminé le rôle de la glycolyse lors de l'accélération de la chaîne respiratoire induite par le FCCP. Nous avons ainsi mesuré la consommation d'oxygène des MOLM-13 dans différents milieux contenant ou non du glucose. En absence de glucose, les MOLM-13 ne peuvent pas accélérer leur chaîne respiratoire tandis qu'en présence de glucose la consommation d'oxygène des MOLM-13 est significativement augmentée en présence de FCCP (Maximal OCR). De la même manière, l'exposition préalable au 2-DG (100mM) inhibe l'accélération de la chaîne respiratoire induite par le FCCP en présence de glucose.

L'activité glycolytique est donc nécessaire pour permettre l'accélération de la chaîne respiratoire suite à une stimulation par le FCCP (Figure 31).

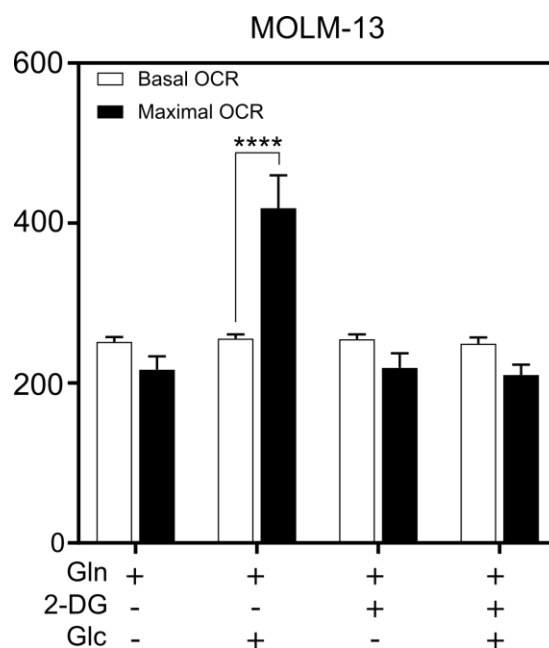


Figure 31. Histogramme représentant la consommation d’oxygène basale et maximale des MOLM-13 dans différents milieux de mesure contenant ou non du glucose et dans des conditions traitées ou non avec du 2-DG (100mM). Glc : Glucose ; Gln : Glutamine ; 2-DG : 2-désoxyglucose (moyenne +/- SEM; n> 3; *p<0,05 ; **p<0,01 ; *p<0,001 ; ****p<0,0001).**

Discussion (du manuscrit en préparation)

Tout d'abord, nos résultats complètent les travaux d'autres équipes démontrant que les différents types de cellules hématopoïétiques saines présentent des phénotypes métaboliques variés tant au niveau du métabolisme oxydatif que du métabolisme glycolytique. Par exemple, les travaux menés par Kramer *et al.* ont mis en évidence que les cellules lymphoïdes ont une consommation d’oxygène différente des cellules myéloïdes et cela pour différents états (Basal, ATP-turnover, proton leak, SRC, Non-mt) (132). Ils décrivent notamment que la consommation basale des lymphocytes est 25% plus faible que celles des monocytes. De plus, ils montrent que les lymphocytes ont une activité glycolytique deux fois plus faible que celles des monocytes. Dans notre étude, nous avons mesuré le métabolisme de monocytes et de cellules dendritiques matures de donneurs sains, deux exemples de cellules myéloïdes à différents états de différenciation. Nous constatons que ces deux types cellulaires présentent des consommations d'oxygènes mitochondriales très différentes suggérant que même au sein de la lignée myéloïde, les phénotypes énergétiques mitochondriaux sont aussi divers. Des analyses d'autres cellules myéloïdes comme les macrophages et les neutrophiles de donneurs sains sont en cours au laboratoire afin de compléter ces résultats.

Depuis les travaux de Warburg (211), il est connu que des cellules saines n'ont pas le même métabolisme que celui des cellules cancéreuses issues du même tissu. La majorité des tissus cancéreux sont notamment caractérisés par une glycolyse aérobie accrue soutenant la prolifération. Mais on sait aujourd'hui que les mitochondries restent fonctionnelles dans la grande majorité des cancers même si leur métabolisme est profondément modifié (212). Plus spécifiquement pour les LAM, Schimmer et coll. ont comparé la phosphorylation oxydative entre des blastes leucémiques de LAM et des cellules hématopoïétiques saines (représentées par des cellules souches hématopoïétiques CD34+ (CSH CD34+) obtenues à partir de cellules mononucléées prélevées chez des volontaires sains ayant été exposés au facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF) (171)). Ils mettent principalement en évidence que la capacité de réserve respiratoire (SRC) des blastes est plus faible que celle observée au niveau des CSH CD34+ sains. Cependant leur étude nécessiterait d'être complétée par un nombre plus important d'échantillons de patients aux vues de la diversité des LAM. Dans notre étude, nous n'avons pas inclus d'échantillons de CSH CD34+ sains, néanmoins nous observons que les cellules isolées de patients atteints de LAM présentent une SRC plus faible que les PBMC ou les cellules dendritiques de donneurs sains.

Dans ce travail, nous avons effectué l'évaluation du métabolisme oxydatif de cellules isolées de 58 patients atteints de LAM. A ce jour, cela constitue une des évaluations fonctionnelles du métabolisme énergétique des LAM incluant le plus de patients prélevés au moment du diagnostic. Pour chacune des composantes métaboliques mesurées à l'aide du XFe24 Seahorse (OCR et ECAR), nous avons observé que ces LAM présentent des phénotypes métaboliques très variés. Ce résultat n'est pas étonnant puisque les LAM sont des maladies hématologiques complexes caractérisées par de multiples mutations et peuvent inclure la coexistence de différents clones chez un même patient. De plus, selon le type de LAM, ces cellules peuvent être bloquées à des stades distincts de la différenciation hématopoïétique. Comme pour les différentes cellules hématopoïétiques saines, il existe donc une hétérogénéité métabolique des LAM. Au regard de ce résultat, nous avons donc évalué si un ou plusieurs paramètres métaboliques mesurés pouvaient être corrélés avec la survie des patients.

Pour chaque patient inclus dans cette étude prospective, les scores ELN ont été établis au moment diagnostique par l'équipe des hématologues du CHU de Lille. Les courbes de survies ont quant à elles été réalisées à la fin de l'étude. Comme attendu, les patients de pronostic favorable selon l'ELN (ELN 1) présentent une survie plus longue que les patients de pronostic intermédiaire (ELN 2) et de pronostic défavorable (ELN 3) (résultats non-montrés). Cette cohorte semble donc adaptée pour étudier de nouveaux biomarqueurs car elle présente des

patients présentant des survies distinctes et conformes aux valeurs pronostiques de l'ELN (83).

Dans un premier temps, les analyses de corrélation ont été effectuées en incluant uniquement les patients présentant un taux de blastes circulants dans le sang supérieur à 30%. En effet, dans cette condition, nous avons observé qu'après élimination des cellules polynucléées du sang par Ficoll, les blastes leucémiques représentent la population majoritaire de cellules dans l'échantillon qui sera utilisé pour l'analyse d'oxymétrie. Des analyses du pourcentage de blastes après Ficoll sont encore en cours d'évaluation.

Tous les paramètres métaboliques mesurés à l'aide du XFe24 Seahorse (OCR Basal, ATP Turnover, Proton Leak, OCR maximale, OCRT non mitochondrial, ECAR basal et ECAR Maximal) ont été comparés vis-à-vis de la survie des patients. Seule la capacité de réserve respiratoire (SRC) présente une corrélation significative avec la survie des patients ; cependant la mesure du Hazard Ratio (qui correspond au risque de survenue de décès) est faible. Nous avons donc complété cette analyse par une procédure de discrétisation qui a pour objectif de maximiser la valeur du Hazard Ratio (HR). Cela consiste à établir statistiquement un seuil à partir de la variable mesurée pour créer deux groupes de patients au-dessus ou au-dessous de ce seuil. Nous avons ainsi démontré que les patients présentant des cellules dont la SRC est supérieure à $75 \text{ pmol d'O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$ présentent une survie significativement plus élevée que les patients avec des cellules dont la SRC est inférieure à $75 \text{ pmol d'O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 150\,000 \text{ cellules}^{-1}$. Pour la première fois, nous avons donc démontré un lien entre la survie des patients atteints de LAM et un paramètre métabolique fonctionnel des LAM.

La cohorte de patients analysée présente des individus d'âges distincts (de 23 à 88 ans). Comme cela a déjà été montré dans d'autres études (213), nous avons observé dans notre cohorte une forte corrélation entre l'âge des patients et leur survie. Selon la même procédure que celle employée pour la SRC, nous avons établi un seuil de 60 ans par procédure de discrétisation qui définit deux groupes de patients qui présentent une survie significativement différente. De manière intéressante, une analyse multivariée analysant conjointement l'âge des patients et la SRC mesurée démontre que ces deux paramètres sont indépendants l'un de l'autre vis à vis de la survie des patients.

Bien que la mesure des paramètres métaboliques soit effectuée sur une population cellulaire présentant majoritairement des blastes (après isolation des cellules mononucléées), d'autres types cellulaires sont présents en proportion variable dans les échantillons analysés. Il s'agit essentiellement de cellules myéloïdes saines ou de lymphocytes. Cependant, nous avons

confirmé que le pourcentage de blastes, qui peut différer d'un échantillon à l'autre, n'est pas corrélé à la survie des patients de notre cohorte. Mais puisque le métabolisme a été mesuré sur des échantillons contenant aussi minoritairement d'autres cellules que des blastes, il est possible que le métabolisme de ces autres cellules hématopoïétiques puisse contribuer aux corrélations avec la survie. En effet, les LAM sont caractérisées par de nombreuses altérations de l'hématopoïèse physiologique. Afin de répondre à cette question, il conviendra de compléter notre étude en séparant les différents sous types cellulaires présents dans l'échantillon afin de comparer leur influence respective sur la survie.

Notre étude a inclus des patients ayant reçu différents protocoles de traitements (Tableau 7) après le diagnostic de la LAM. D'autres études ont montré que la réponse aux traitements pouvait être différente en fonction du métabolisme des cellules leucémiques (Bosc *et al.*, 2020). Cette étude devra donc être complétée en analysant des cohortes de patients ayant reçu des protocoles thérapeutiques similaires.

En parallèle de nos analyses métaboliques, les mutations de l'ADN nucléaire des cellules leucémiques des patients ont été réalisées selon les protocoles en vigueur dans le cadre des diagnostics des LAM. Nous n'avons pas observé de mutations qui puissent exclusivement être associées aux patients présentant des blastes à faible ou forte capacité de réserve respiratoire (high ou low SRC). Cependant les mutations de IDH2 et TP53 sont significativement plus représentées chez les patients caractérisés par des blastes low SRC. Ce résultat pourrait s'expliquer au moins partiellement par le fait que les patients porteurs de la mutation d'IDH2 ou TP53 ont une survie plus faible que les patients porteurs de la forme sauvage de ces gènes (214). Compte-tenu de la diversité des anomalies moléculaires retrouvées dans les LAM (cf Tableau 10), notre cohorte ne comporte pas suffisamment d'individus pour réaliser des analyses statistiques robustes de corrélation entre la SRC et toutes les mutations décrites dans les LAM, notamment les plus rares. Pour répondre à cette question, il faudra étendre nos résultats à des cohortes plus importantes.

La capacité de réserve respiratoire que nous avons mesurée dans cette étude correspond aux capacités d'accélération de la chaîne respiratoire des cellules après traitement par le protonophore FCCP. Nous avons aussi clairement démontré que l'oxydation du pyruvate *via* la pyruvate déshydrogénase était une voie majeure activée après traitement par le FCCP dans des blastes de patients ou dans diverses lignées de LAM. A l'inverse, l'oxydation de la glutamine n'est pas nécessaire lors de l'accélération de la chaîne respiratoire. En outre, la contribution de l'oxydation des acides-gras devra être confirmée par une étude de

métabolomique avec du palmitate marqué au ^{13}C , puisque l'inhibition de CPT-1 par l'étomoxir réduit partiellement la capacité de réserve respiratoire dans les blastes de patients.

Le modèle d'accélération de la chaîne respiratoire induite par le FCCP est un modèle reconnu et largement utilisé pour évaluer la capacité de réserve respiratoire des cellules par oxymétrie (168,171,215,216). Cependant d'autres modèles pourraient conforter nos résultats sur le rôle de l'oxydation du pyruvate dans ce contexte. Nous mesurerons l'accélération de la chaîne respiratoire à l'aide de cellules leucémiques perméabilisées incubées en présence d'ADP et Pi. Dans ce modèle, c'est l'augmentation d'activité de l'ATP synthase qui soutient l'accélération de la consommation d'oxygène et non la diffusion extra-physiologique de protons induit par le FCCP au niveau de la membrane interne mitochondriale.

En conclusion, nous avons démontré qu'il existait une hétérogénéité du métabolisme oxydatif des blastes de patients de LAM et que la capacité de réserve respiratoire permet de distinguer deux populations de patients dont la survie est significativement différente. La suite de cette étude nécessitera d'accroître la taille de la cohorte analysée mais aussi de confirmer les résultats sur une nouvelle cohorte indépendante. Les résultats obtenus permettront ainsi de valider l'utilisation de la SRC en tant que biomarqueur potentiel de la survie des patients.

Références

Les références de ce manuscrit sont à trouver dans la partie Bibliographie du manuscrit de thèse.

Discussion Générale

Associer des biomarqueurs génotypiques et de nouveaux biomarqueurs phénotypiques pour le suivi des LAM.

L'évaluation des caractéristiques cytologiques et moléculaires des cellules du sang et de la moelle constituent la base du diagnostic et du suivi des patients atteints de LAM. L'accès aux cellules leucémiques est aisé du fait de leur présence dans le sang et la moelle osseuse. Les progrès technologiques ont favorisé le développement considérable des techniques de séquençage (séquençage whole exome WES, séquençage de nouvelles génération NGS) et permettent aujourd'hui de détecter de manière fiable la plupart des mutations de ces blastes leucémiques (217). En outre, le seuil de détection de ces altérations a considérablement diminué permettant l'identification de sous-populations clonales très faiblement représentées (218). Ces multiples informations permettent d'améliorer le diagnostic et d'orienter les choix thérapeutiques des cliniciens. Cependant les marqueurs moléculaires des LAM (génotype) ne sont pas complètement prédictifs de la réponse aux traitements, notamment car ces anomalies moléculaires ne s'expriment pas obligatoirement au niveau du phénotype final des cellules leucémiques. Ce travail de thèse s'inscrit donc dans le développement de biomarqueurs métaboliques caractéristiques du phénotype des blastes leucémiques afin de compléter les analyses moléculaires réalisées en routine dans le cadre des LAM.

L'analyse de la consommation d'oxygène des blastes comme biomarqueur de l'OXPPOS.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons établi un protocole permettant à partir de 3 tubes de sang, d'isoler les PBMC de patients atteints de LAM et d'évaluer leur activité métabolique dans différents états aussi bien au niveau de la consommation d'oxygène (Basal, ATP Turnover, Proton Leak, Maximal, Spare Respiratory Capacity (SRC), non-mitochondrial) qu'au niveau de l'activité glycolytique *via* la mesure de l'acidification extracellulaire (ECAR basal et ECAR Max). Les échantillons de LAM ont été obtenus auprès de patients hospitalisés entre 2018 et 2021 dans le service d'hématologie du CHU de Lille ou du service d'hématologie du CHU de Toulouse, après obtention de leur consentement éclairé conformément à la Déclaration d'Helsinki et l'approbation du comité d'éthique institutionnel (CPP Lille). Nous avons ainsi montré que le métabolisme énergétique des blastes pouvait être mesuré immédiatement après leur prélèvement chez le patient, après une étape de culture

jusqu'à 18h après le prélèvement ou après cryoconservation pendant plusieurs mois et remise en culture. En outre, nous avons montré que ces analyses pouvaient être réalisées sur des cellules isolées à partir de sang périphérique ou de moelle osseuse.

Ce protocole d'étude a été établi en anticipant les éventuelles contraintes pouvant être rencontrées dans un service d'analyse biomédical. Ainsi, nous avons développé les protocoles d'analyses de l'OXPPOS des LAM sur les deux types d'analyseur de flux extracellulaires (oxymètre XFe24 et XFe96) afin de pouvoir s'adapter à l'équipement déjà disponible des différents CHU. Ensuite, bien qu'il soit possible d'analyser le métabolisme des blastes immédiatement après prélèvement, les contraintes matérielles sont nombreuses incluant la disponibilité immédiate de personnels techniques formés et d'appareillages présents sur le site. C'est pourquoi notre étude a montré qu'il était possible de mesurer le métabolisme énergétique des cellules leucémiques de patients, même si elles étaient maintenues en culture pendant 18 heures en présence de différentes cytokines ou cryopréservées puis remises en culture. Les mesures des paramètres évalués de ces cellules ne sont pas divergentes par rapport à une mesure sur des échantillons analysés immédiatement après le prélèvement. L'utilisation d'échantillons cryopréservés implique néanmoins une perte de cellules plus importante notamment dû aux phénomènes de "clumping" à la décongélation qui est le signe d'une lyse cellulaire responsable de la libération d'ADN qui engendrera une agglutination cellulaire. Toutefois l'utilisation de DNase permet de se prémunir de ces phénomènes dans le cadre d'échantillon présentant peu d'ADN libre.

Cela ouvre donc la possibilité pour de futurs travaux d'utiliser de larges cohortes d'échantillons de patients cryopréservés par les organismes coopérateurs tels que la FILO ou l'ALFA. Ces échantillons ayant été prélevés dans le cadre de protocoles cliniques d'inclusion, ils présenteront des caractéristiques clinico-biologique proches et auront reçu une prise en charge thérapeutique similaire. L'évaluation des caractéristiques métaboliques chez ces patients permettra de valider les résultats obtenus dans cette étude mais également de pouvoir avoir recours à des analyses biostatistiques plus poussées qui pourront intégrer des approches multivariées.

Un protocole adapté pour évaluer l'efficacité des nouveaux traitements anticancéreux ciblant les mitochondries.

Le métabolisme mitochondrial est aujourd'hui une cible thérapeutique d'intérêt en cancérologie et particulièrement dans les LAM (219). De nouvelles molécules (MitoCANS) sont évaluées dans le cadre d'essais cliniques pour le traitement des LAM en monothérapie :

ciblant les protéines de la chaîne respiratoire (ex: IACS-010759), le métabolisme de la glutamine (CB839) ou la traduction des protéines mitochondriales (tigécycline); des associations de molécules ciblant le métabolisme mitochondrial avec des traitements conventionnels sont aussi évalués (ex: metformin avec la cytarabine). Pour une liste exhaustive, voir la revue (220).

Dans un travail complémentaire à mon sujet de thèse (Annexe 4), j'ai aussi étudié une association de molécules ciblant les mitochondries et de traitements conventionnels. J'ai ainsi démontré que le ciblage du métabolisme mitochondrial par des L-asparaginases en association avec un inhibiteur de tyrosine kinase permettait d'éliminer les cellules souches de leucémie myéloïde chronique (215). En effet, j'ai montré que les inhibiteurs de tyrosine kinase (Imatinib, Dasatinib, Nilotinib) supprimaient la glycolyse dans un large panel de lignées cellulaires BCR-ABL1 + ainsi que dans les cellules souches CD34+ de patients atteints de leucémies myéloïdes chroniques (LMC). Cependant, dans ce contexte, l'oxydation mitochondriale de la glutamine soutient la synthèse d'ATP et la survie de cellules persistantes après le traitement. Le métabolisme de la glutamine a été alors inhibé par les L-asparaginases telles que la Kidrolase ou l'Erwinase. La combinaison de TKI avec la L-asparaginase a réactivé la voie apoptotique intrinsèque conduisant à une mort cellulaire efficace des cellules de LMC. Ainsi, le ciblage du métabolisme de la glutamine avec les L-asparaginases (médicament cliniquement approuvé dans d'autres pathologies comme pour le traitement des Leucémies lymphoïdes chroniques), en combinaison avec le TKI qui supprime la glycolyse, représente une stratégie thérapeutique efficace et largement applicable pour éradiquer les cellules souches de la LMC. D'autres travaux menés par l'équipe du Pr. Bouscary ont par ailleurs démontré l'efficacité des L-asparaginases pour éradiquer directement les cellules de LAM en monothérapie (221).

La méthodologie de mesure de l'OXPPOS que nous avons mise en place pourrait donc s'avérer être un outil pertinent pour évaluer l'efficacité de ces traitements ciblant le métabolisme mitochondrial à partir de cellules prélevées sur des patients exposés à ces traitements dans le cadre d'essai clinique.

La SRC des blastes, paramètre supplémentaire pour améliorer la classification ELN ?

En utilisant un protocole validé, nous avons donc analysé de manière prospective les blastes de 58 patients atteints de LAM (CHU de Lille et Toulouse). L'ensemble de l'étude a été réalisé après 18h de culture en présence de cytokines et a révélé que l'une des composantes associées à la consommation d'oxygène, la capacité de réserve respiratoire (SRC) permettait

de distinguer deux populations de patients dont les survies sont significativement différentes. La mise en évidence de la SRC comme un paramètre métabolique associé à la survie des patients pourrait donc compléter les paramètres intégrés dans les futures classifications pronostiques. En effet, la Classification European LeukemiaNet constitue la base du diagnostic et du suivi des LAM, mais elle présente certaines limitations prédictives. Puisque de nouvelles classifications se développent, il serait intéressant d'étudier l'apport de l'intégration de la SRC à côté des autres variables actuellement envisagées pour améliorer l'évaluation pronostique des patients. Des cliniciens et des bioinformaticiens constituent actuellement des algorithmes complexes *via* le recours à l'intelligence artificielle. On retrouve notamment l'algorithmique multi-étapes mis au point par Gerstung *et al.* qui permet de calculer la survie d'un patient en intégrant ses variables cliniques (âge, sexe, ECOG, NFS, LAM *de novo* ou secondaire), ses variables génétiques (mutation et anomalies chromosomiques) et la possibilité d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques (222). La mesure de la SRC que nous avons caractérisée dans notre étude pourrait venir compléter ces autres variables.

Les signatures génétiques de l'OXPPOS comme biomarqueur du suivi des LAM.

Le métabolisme des LAM et en particulier le fonctionnement énergétique des mitochondries est identifié dans plusieurs modèles comme un facteur influençant la réponse aux thérapies antitumorales (6,90,223,224). Cela a été montré particulièrement par l'équipe du Dr. Sarry qui a identifié des signatures de gènes relatifs au fonctionnement de la phosphorylation oxydative dans les LAM. Ils ont montré que la signature d'expression de gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative (OXPPOS) des cellules leucémiques résistantes est prédictive de la réponse au traitement par la cytarabine (AraC) dans des xénogreffes dérivées de patients atteints de LAM (PDX) (91,225). En outre, cette signature génique OXPPOS élevée est retrouvée dans le transcriptome des patients qui ont une survie globale plus courte post-chimiothérapie intensive (Farge *et al.* 2017 et données non publiées). Enfin, l'OXPPOS est un marqueur de stratification des patients prédictif d'une réponse efficace au vénétoclax + cytarabine mais pas au venetoclax + azacitidine (216). Ces résultats permettront une meilleure prise en charge des patients puisque des résultats prometteurs ont été obtenus récemment chez les patients traités par l'inhibiteur de BCL-2 vénétoclax associé à la cytarabine à faible dose (LDAC) ou agents hypométhylants (HMA) mais les échecs thérapeutiques sont encore mal compris (226).

Dans notre étude, nous avons évalué le statut de OXPPOS en mesurant directement la consommation d'oxygène des blastes. Des études sont en cours avec l'équipe du Dr. Sarry, pour comparer nos mesures de métabolisme fonctionnel des blastes aux signatures OXPPOS qu'ils ont identifiées.

En outre, dans le cadre de cette thèse et en collaboration avec cette équipe, nous avons contribué à la validation fonctionnelle du Mitoscore (basé sur la signature REACTOME_TCA_ETC) en montrant par oxymétrie que la SRC des blastes des patients atteints de LAM était corrélée à leur sensibilité *ex vivo* à la combinaison Ventoclastax + Cytarabine, mais pas à la combinaison Venetoclastax + Azacitidine (216) (Figure 32).

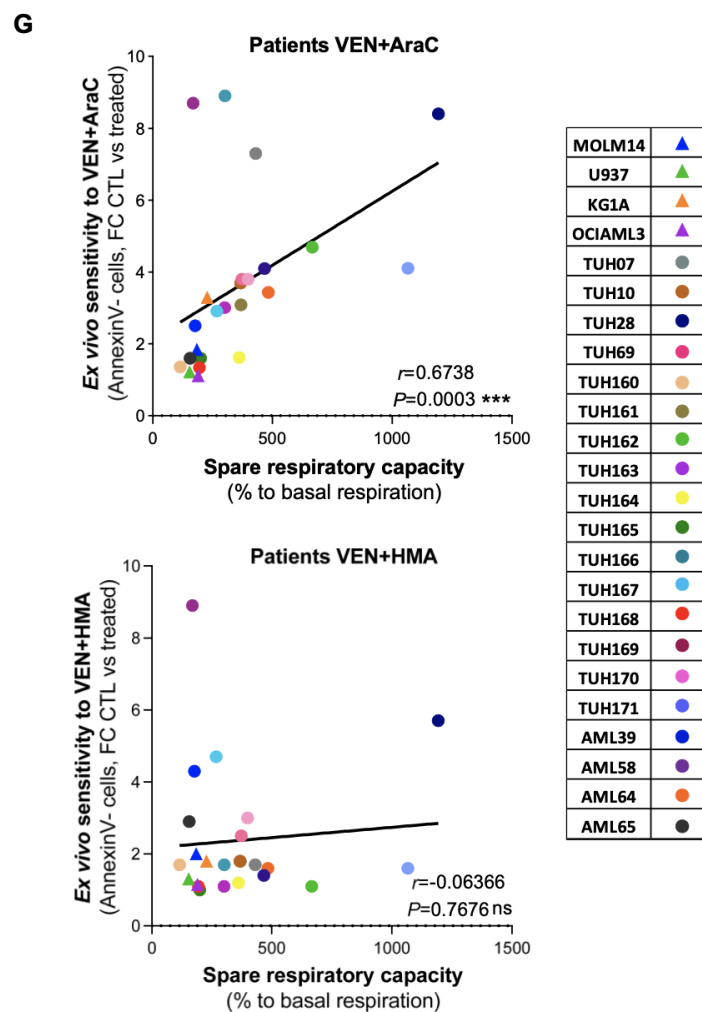


Figure 32. Capacité respiratoire de réserve (SRC) mesurée *ex vivo* par l'analyseur extracellulaire Seahorse XFe24 en fonction de la cytotoxicité des combinaisons Ven+ARAc ou Ven+AZA. La sensibilité *ex vivo* au VEN (50 nM) + AraC (25 μM) mais pas celle au VEN (50nM) + azacitidine (1 μM) est corrélée à la SRC (exprimé en pourcentage de la respiration basale). Reproduit avec permission de l'article Bosc *et al.*, 2020.

A partir des analyses de transcriptomiques (par séquençage de l'ARN) que nous réaliserons chez les blastes de patients caractérisés par une faible ou une forte SRC de notre cohorte, nous développerons aussi de nouvelles signatures de gènes mitochondriaux spécifiques de ce phénotype. Nous pourrions alors évaluer, avec les bases de données disponibles cette nouvelle signature vis-à-vis de la survie des patients dans d'autres cohortes de LAM dont les caractéristiques ont déjà été publiées.

Pourquoi une faible SRC est un facteur délétère de la survie des patients ?

Dans notre étude, nous avons montré que les patients présentant des blastes à faible SRC (low SRC) présentent une survie plus courte que les patients avec des blastes à forte SRC (high SRC).

En parallèle, nous avons observé que les blastes "low SRC" sont aussi caractérisés par une faible consommation d'oxygène basale et une plus faible activité glycolytique. Il est généralement admis que le métabolisme oxydatif mitochondrial et glycolytique des cellules quiescentes est plus faible que celui de cellules en prolifération (115). Il serait donc intéressant de déterminer la proportion de cellules quiescentes dans les blastes "high" et "low" SRC. En effet, les cellules quiescentes sont plus réfractaires aux agents cytotoxiques (cf : 1.8.2.1.) et pourraient expliquer le caractère délétère du phénotype "low SRC".

En parallèle, il serait pertinent d'évaluer le pourcentage de cellules souches leucémiques dans ces deux populations de patients. Le score LSC-17 du caractère souche de ces cellules (stemness) pourra notamment être évalué à partir des analyses transcriptomiques des patients de notre cohorte. Des mesures de la production de ROS de ces cellules pourraient également être réalisées par cytométrie en flux puisque des études ont montré une différence entre des cellules souches leucémique (CSL) présentant un faible niveau de ROS et les cellules blastiques présentant un plus fort niveau de ROS (227).

Développer des modèles de lignées leucémiques "high SRC" ou "low SRC" pourrait aussi permettre d'évaluer l'influence de la SRC sur l'agressivité des leucémies et leurs réponses aux traitements. A ce jour, nous n'avons pas identifié les modifications moléculaires à l'origine de ce phénotype particulier. Cependant nos résultats démontrent l'importance de la voie d'oxydation du pyruvate au cours de l'accélération de la chaîne respiratoire. Le métabolisme du pyruvate a déjà été identifié comme important dans la leucémogénèse. Wang *et al.* ont montré sur des modèles murins invalidés pour l'expression (« knock-out ») de PKM2 ou de LDH-A que l'induction de l'expression du transcrit de fusion MLL-AF9 dans des cellules de la moelle osseuse murine provoquait une diminution du métabolisme oxydatif qui était

associée à une augmentation du potentiel leucémogène (228). Pour la suite de ce travail, nous nous focaliserons notamment sur la régulation des différents enzymes et transporteurs du pyruvate dans les LAM "high SRC" ou "low SRC" tels que la pyruvate kinase (PK), la lactate déshydrogénase (LDH), le mitochondrial pyruvate carrier (MPC), la pyruvate déshydrogénase (PDH), la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK), la pyruvate déshydrogénase phosphatase (PDP), les transporteurs des monocarboxylates (MCT) ou encore la citrate synthase (CS).

La SRC comme biomarqueur dans d'autres pathologies ?

Dans d'autres contextes physiopathologiques, différentes équipes se sont intéressées à l'évaluation du métabolisme mitochondrial en tant que biomarqueur de réponse aux traitements. Par exemple, dans le myélome multiple, une hémopathie maligne affectant les plasmocytes, Bajpai *et al.* ont montré que les lignées cellulaires les plus sensibles au venetoclax étaient celles dont l'activité de la chaîne respiratoire était la plus faible (88). Par ailleurs Teh *et al.* (2019) ont également démontré que la sensibilité à la metformine, un inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire, de différentes lignées cellulaires cancéreuses était associée à leur niveau de SRC (89).

Aux vues des données de la littérature et de nos résultats, étudier la SRC dans d'autres types d'hémopathies semble donc potentiellement pertinent. Nous évaluerons ainsi la SRC des cellules de la moelle de patients atteints de syndrome myélodysplasique (SMD) qui est une hémopathie clonale caractérisée par une prolifération excessive de progéniteurs myéloïdes qui se différencient de manière anormale et pouvant évoluer en LAM (229). A l'aide d'approches biostatistiques similaires à celles utilisées dans cette thèse, nous pourrions notamment étudier si la mesure SRC est prédictive de la transformation de la SMD en LAM.

L'activité glycolytique, autre biomarqueur du suivi des LAM ?

Dans cette étude, nous n'avons pas observé de corrélation entre la survie des patients et l'acidification extracellulaire basale (ECAR basal) ou l'acidification après inhibition de l'ATP-synthase (ECAR Max). Cependant, Herst *et al.*, avec une méthodologie différente, ont montré à partir de blastes issus de la moelle osseuse de patients au diagnostic, que l'activité glycolytique pouvait être associée à la survie (139). En effet, en évaluant l'activité glycolytique à partir de la réduction du colorant 2-(4-iodophényl)-3-(4-nitrophényl)-5-(2,4-disulfophényl)-2H-tétrazolium (WST-1), ces auteurs ont déterminé qu'une partie des patients (9/26) présentait des blastes avec un métabolisme glycolytique plus élevé. En étudiant la survie des patients classés selon l'activité glycolytique de leurs blastes, ils ont pu mettre en

évidence qu'un métabolisme glycolytique élevé au moment du diagnostic était associé à une survie plus longue après induction par chimiothérapie. Ils ont par ailleurs démontré que la corrélation entre la glycolyse et la survie était indépendante du pourcentage de blastes médullaires, de l'âge du patient et du groupe pronostic.

Cependant dans notre étude, nous n'avons pas mesuré la part de l'acidification extracellulaire indépendante de la glycolyse habituellement mesurée en présence de 2-DG ou en absence de glucose (230,231). L'évaluation de ce paramètre supplémentaire pourrait ainsi permettre d'affiner nos résultats concernant le lien entre l'activité glycolytique et la survie.

Perspectives

Après avoir identifié la capacité de réserve respiratoire (SRC) comme un biomarqueur potentiel de la survie des patients atteints de LAM, nous proposons de valider ce biomarqueur à l'aide d'autres cohortes indépendantes disposant d'un nombre plus important de patients. Puis, nous déterminerons si la SRC mesurée au moment du diagnostic est aussi un biomarqueur de la réponse aux traitements des patients atteints de LAM. Nous caractériserons également les processus biochimiques et les acteurs impliqués dans son contrôle métabolique. Enfin nous déterminerons l'influence de la SRC sur la résistance aux médicaments anticancéreux.

Validation de la SRC en tant que biomarqueur prédictif de la survie des patients atteints de LAM.

Nous réaliserons une nouvelle étude rétrospective en mesurant la consommation d'oxygène et l'activité glycolytique de blastes cryopréservés (cohorte de 120 patients) obtenus auprès des groupes coopérateurs français de la LAM : ALFA et FILO. Notre objectif sera de caractériser l'organisation métabolique de LAM incluant la consommation d'oxygène basale, dépendante de la production d'ATP (ATP-turnover), reliée à la fuite de protons (proton leak), maximale, la capacité de réserve respiratoire (SRC) et la consommation d'oxygène non-mitochondriale ainsi que l'acidification extracellulaire basale (ECAR basal), maximale (ECAR Max) et indépendante de l'activité glycolytique. La SRC sera mesurée à l'aide d'un fluorimètre XF96e Seahorse après exposition des cellules à plusieurs protonophores différents (FCCP et BAM15).

A l'aide des données clinico-biologiques, ce travail nous permettra aussi d'établir des corrélations entre la réponse aux différents protocoles de traitements des patients (absence de réponses, rémissions partielles ou totales) et le phénotype métabolique de leurs blastes (high ou low SRC) mais également de valider l'utilisation de la SRC en tant que biomarqueur de la survie des patients atteints de LAM.

Détermination des signatures géniques du métabolisme mitochondrial.

En collaboration avec le laboratoire du Dr. Sarry (CRCT Toulouse), nous analyserons le transcriptome des blastes "low" et "high" SRC par RNAseq puis nous déterminerons dans chaque population l'enrichissement des gènes liés au métabolisme mitochondrial (analyse

GSEA) tel qu'il a été réalisé précédemment (90). Notre objectif sera de déterminer une signature génique (enrichissement) spécifique de chaque population. En complément, nous calculerons le «mitoscore» basé sur le z-score de la signature de gènes «REACTOME_TCA_ETC» (216).

Évaluation sur « cellule unique » du métabolisme oxydatif mitochondrial des blastes par mesure de l'oxygénation intracellulaire en temps réel.

Les analyses génomiques réalisées sur les LAM durant les dernières années ont prouvées que plusieurs sous-populations clonales de blastes pouvaient coexister chez un même patient (232). En complément des analyses d'oxymétrie, certains échantillons de blastes seront analysés par microscopie confocale time laps à l'aide de la sonde «nanoparticle probe MitoImage-MM2» afin d'évaluer la capacité de réserve respiratoire individuellement sur chaque cellule d'une population (approche « single cell ») (233).

Identification des traitements modulant la SRC.

A l'aide du Seahorse XFe96e, nous évaluerons à partir d'un panel de molécules (SCREEN-WELL® Cancer Library - Enzo Life Sciences et SCREEN-WELL® FDA approved drug library V2), les composés les plus susceptibles de moduler la SRC de différentes lignées leucémiques (HL-60, MOLM-13 et OCI-AML3). Puis l'efficacité de ces modulateurs positifs ou négatifs de la SRC sera vérifiée sur des blastes de patients (high ou low SRC). **Ces résultats permettront d'accroître les connaissances sur les effets métaboliques des médicaments anticancéreux. Ils permettront aussi de sélectionner des outils pharmacologiques pour moduler ultérieurement la SRC.**

Identification des acteurs modulant la SRC.

Nos résultats montrent clairement que l'oxydation du pyruvate est impliquée dans le contrôle de la SRC des blastes. Cependant les protéines et enzymes liées au phénotype à high ou low SRC ne sont pas encore identifiées. La réalisation d'analyse transcriptomique permettra d'identifier des cibles potentielles.

En parallèle de cette approche nous utiliserons une banque de siRNA (Silencer™ Custom Designed siRNA Invitrogen™) et réaliserons un screening en plaque de 50 principales enzymes impliquées dans le métabolisme du pyruvate (KEGG pathway) en mesurant après transfection la SRC des lignées leucémiques HL-60, MOLM-13 et OCI-AML3 transfectées. A

l'aide de cette approche, nous pourrions mettre en place des modèles de LAM à "high" ou "low" SRC.

Caractérisation des mécanismes biochimiques impliqués dans l'activation ou la répression de la SRC.

Nos résultats démontrent que l'oxydation du pyruvate issu de la glycolyse est augmentée lors de l'accélération de la chaîne respiratoire des blastes. Cependant les lignées leucémiques MOLM-13 shMPC2 (dans lesquelles l'import mitochondrial du pyruvate est profondément diminué) maintiennent encore une SRC même si celle-ci est diminuée (Figure 27). Dans des conditions où la concentration en pyruvate mitochondrial est limitée, les cellules leucémiques pourraient donc utiliser d'autres substrats. Pour déterminer ces mécanismes, nous réaliserons des expériences de fluxomiques à l'aide de ¹³C-glutamine et de ¹³C-palmitate dans les lignées MOLM-13 shMPC2. Les métabolites issus de ces « tracers » seront quantifiés par spectrométrie de masse à l'Université de Leuven, Belgique (Collaboration avec le Pr. Ghesquière).

En complément, nous isolerons les mitochondries de blastes (high ou low SRC) et nous mesurerons la SRC dans un environnement défini en nutriments (exemple : en présence ou non de pyruvate, glutamate, malate, α -cétoglutarate ou palmitate).

Ces expériences viendront renforcer les connaissances sur les mécanismes de contrôle de la SRC et permettront de déterminer pourquoi deux phénotypes métaboliques (high et low SRC) sont observés chez les blastes de différents patients atteints de LAM.

Evaluation de la résistance aux traitements des modèles de LAM high ou low SRC.

Nous utiliserons un automate couplé à un fluorimètre (Cytation 5) afin de mesurer la mort cellulaire (*via* la translocation des phosphatidylsérines) des LAM high ou low SRC exposées aux traitements conventionnels (Cytarabine, Vidaza, Daunorubicine) ou à des thérapies ciblées avec les lignées leucémiques appropriées (inhibiteurs de FLT3, inhibiteurs d'IDH et inhibiteurs de Bcl-2).

De plus, l'efficacité des médicaments anticancéreux dépend au moins en partie de leur capacité à induire la mort cellulaire *via* la voie intrinsèque mitochondriale. Ce « priming » mitochondrial est mesuré après perméabilisation des cellules leucémiques et incubation avec des peptides pro-apoptotiques de la famille BH3-only (234). Nous réaliserons ainsi des expériences de « priming mitochondrial » pour déterminer si la modulation de la SRC affecte la capacité des traitements à induire l'apoptose. Nous pourrions alors comparer notre potentiel

biomarqueur métabolique à ce biomarqueur apoptotique, admis aujourd'hui comme particulièrement relevant.

Diversification des modèles d'accélération de la chaîne respiratoire.

Dans ce travail nous avons choisi d'accélérer l'activité de la chaîne respiratoire en utilisant du FCCP pour son rôle protonophore. Le recours au FCCP pour augmenter la consommation d'oxygène des LAM a déjà été utilisé dans de nombreux articles (112,143,161,171,204). Cependant ce type d'approche nécessite l'inhibition de la FoF1 ATP-synthase. La cellule va donc répondre à un stress énergétique induit de manière non-physiologique, même si les mécanismes responsables de la régulation de la biodisponibilité des métabolites au niveau mitochondrial seront conservés.

En complémentarité de cette approche, d'autres modèles seront utilisés. En effet, en ayant recours à la perméabilisation membranaire ou à l'isolation de mitochondrie, il est possible d'utiliser directement dans le milieu de l'ADP qui stimulera l'activité de la FoF1 ATP-synthase et engendrera une entrée de protons (235). En réponse à cette entrée, la chaîne respiratoire augmentera son activité.

Nous pourrions alors déterminer si les différences métaboliques observées entre les blastes high et low SRC sont conservées ou non dans ces autres modèles d'accélération de la chaîne respiratoire.

Finalité

La finalité de ce projet est de déterminer l'influence du métabolisme mitochondrial, et plus particulièrement de la SRC (encore peu étudiée), sur l'efficacité des médicaments anticancéreux (chimiothérapie ou thérapie ciblée) dans le traitement des LAM. Cette nouvelle stratégie devrait s'avérer efficace pour améliorer le traitement des patients atteints de LAM en établissant des biomarqueurs métaboliques pour prédire l'efficacité des traitements et développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour éradiquer les LAM en ciblant leur métabolisme.

Conclusion générale

Grâce à ce travail de thèse, nous confirmons l'importance de la mesure du métabolisme mitochondrial des LAM pour le suivi des patients. Nous avons montré que le métabolisme énergétique mitochondrial et plus particulièrement la capacité de réserve respiratoire, constituait un potentiel biomarqueur pronostique de la survie des patients. La prise en compte de ce paramètre devrait permettre d'affiner la classification ELN en apportant un nouvel élément, qui permettrait de compléter les marqueurs utilisés à l'heure actuelle. A plus long terme, la prise en compte du statut énergétique des blastes en plus de leur statut mutationnel, pourrait permettre d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patients atteints de LAM en leur proposant un schéma thérapeutique basé sur une médecine de précision.

Bibliographie

1. Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X, Zeidan AM. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood Rev.* 2019;36:70–87.
2. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Ebert BL, et al. Global Acute Myeloid Leukemia Epidemiology and Patient Flow Analysis 2016. *Blood.* 2017;129(4):424–48.
3. Lohse I, Statz-Geary K, Brothers SP, Wahlestedt C. Precision medicine in the treatment stratification of AML patients: Challenges and progress. *Oncotarget.* 2018;9(102):37790–7.
4. Yeoh ZH, Bajel A, Wei AH. New Drugs Bringing New Challenges to AML : A Brief Review. 2021;
5. Valli D, Gruszka AM, Alcalay M. Has Drug Repurposing Fulfilled Its Promise in Acute Myeloid Leukaemia? *J Clin Med.* 2020;9(6):1892.
6. Stuani L, Sabatier M, Sarry J-E. Exploiting metabolic vulnerabilities for personalized therapy in acute myeloid leukemia. *BMC Biol* [Internet]. 2019;17(1):57. Available from: <https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12915-019-0670-4>
7. Zeichner SB, Arellano ML. Secondary Adult Acute Myeloid Leukemia: a Review of Our Evolving Understanding of a Complex Disease Process. *Curr Treat Options Oncol.* 2015;16(8).
8. Nguyen P, Cioc A, Cerhan JR, Warlick E. Myelodysplastic Syndromes in a Population-Based Study. 2018;140(1):612–25.
9. Lichtman MA. Obesity and the Risk for a Hematological Malignancy: Leukemia, Lymphoma, or Myeloma. *Oncologist.* 2010;15(10):1083–101.
10. Koklu H, Tufan A, Erkul Y, Akyurek N, Civelek R. Secondary acute myeloid leukemia arising early after cyclophosphamide treatment. *Int J Clin Pharm.* 2015;37(2):289–91.
11. Le Deley MC, Leblanc T, Shamsaldin A, Raquin MA, Lacour B, Sommelet D, et al. Risk of secondary leukemia after a solid tumor in childhood according to the dose of epipodophyllotoxins and anthracyclines: A case-control study by the Société Française d’Oncologie Pédiatrique. *J Clin Oncol.* 2003;21(6):1074–81.
12. Hochhaus A, Larson RA, Guilhot F, Radich JP, Branford S, Hughes TP, et al. Long-term outcomes of imatinib treatment for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2017;376(10):917–27.
13. Iurlo A, Cattaneo D, Gianelli U. Blast transformation in myeloproliferative neoplasms: Risk factors, biological findings, and targeted therapeutic options. *Int J Mol Sci.* 2019;20(8):1–13.
14. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 1999 Sep 30;341(14):1051–62.
15. Lagadinou ED, Sach A, Callahan K, Rossi RM, Neering SJ, Minhajuddin M, et al. BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2013;12(3):329–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2012.12.013>
16. Vetrie D, Helgason GV, Copland M. The leukaemia stem cell: similarities, differences and clinical prospects in CML and AML. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2020;20(3):158–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41568-019-0230-9>
17. Thomas D, Majeti R. Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood.* 2017;129(12):1577–85.
18. Culp-Hill R, D’Alessandro A, Pietras EM. Extinguishing the Embers: Targeting AML Metabolism. *Trends Mol Med* [Internet]. 2021;27(4):332–44. Available from:

- <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.10.001>
19. van Galen P, Hovestadt V, Wadsworth MH, Hughes TK, Griffin GK, Battaglia S, et al. Single-Cell RNA-Seq Reveals AML Hierarchies Relevant to Disease Progression and Immunity. *Cell* [Internet]. 2019;176(6):1265-1281.e24. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.031>
 20. Béné MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W, et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: A consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia*. 2011;25(4):567–74.
 21. Costello R, Venton G, Colle J, Ivanov V, Mercier C, Delassus L, et al. Leucémies aiguës myéloïdes de l'adulte. 2020;13(18):1–13.
 22. Piaton E, Fabre M, Goubin-Versini I, Bretz-Grenier MF, Courtade-Saïdi M, Vincent S, et al. Technical recommendations and best practice guidelines for May-Grünwald-Giemsa staining: Literature review and insights from the quality assurance. *Ann Pathol*. 2015;35(4):294–305.
 23. Hosseini M, Rezvani HR, Aroua N, Bosc C, Farge T, Saland E, et al. Targeting myeloperoxidase disrupts mitochondrial redox balance and overcomes cytarabine resistance in human acute myeloid leukemia. *Cancer Res*. 2019;79(20):5191–203.
 24. Mitchell K, Steidl U. Targeting immunophenotypic markers on leukemic stem cells: How lessons from current approaches and advances in the Leukemia stem cell (LSC) model can inform better strategies for treating acute myeloid leukemia (AML). *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2020;10(1).
 25. Yanada M, Mori J, Aoki J, Harada K, Mizuno S, Uchida N, et al. Effect of cytogenetic risk status on outcomes for patients with acute myeloid leukemia undergoing various types of allogeneic hematopoietic cell transplantation: an analysis of 7812 patients. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2018;59(3):601–9. Available from: <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1357173>
 26. Krause DS, Van Etten RA. Right on target: eradicating leukemic stem cells. *Trends Mol Med*. 2007;13(11):470–81.
 27. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. 'Acute myeloid leukemia: A comprehensive review and 2016 update.' *Blood Cancer J*. 2016;6(7).
 28. Henry NL, Hayes DF. Cancer biomarkers. *Mol Oncol* [Internet]. 2012;6(2):140–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molonc.2012.01.010>
 29. LIU Y, HE P, LIU F, SHI L, ZHU H, ZHAO J, et al. Prognostic significance of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia: A meta-analysis. *Mol Clin Oncol*. 2014;2(2):275–81.
 30. Pollyea DA, Jordan CT. Therapeutic targeting of acute myeloid leukemia stem cells. *Blood*. 2017;129(12):1627–35.
 31. Verhagen HJMP, Smit MA, Rutten A, Denkers F, Poddighe PJ, Merle PA, et al. Primary acute myeloid leukemia cells with overexpression of EVI-1 are sensitive to all-trans retinoic acid. *Blood*. 2016;127(4):458–63.
 32. Alfayez M, Kantarjian H, Kadia T, Ravandi-Kashani F, Daver N. CPX-351 (vyxeos) in AML. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2020;61(2):288–97. Available from: <https://doi.org/10.1080/10428194.2019.1660970>
 33. Walter RB, Othus M, Borthakur G, Ravandi F, Cortes JE, Pierce SA, et al. Prediction of early death after induction therapy for newly diagnosed acute myeloid leukemia with pretreatment risk scores: A novel paradigm for treatment assignment. *J Clin Oncol*. 2011;29(33):4417–23.
 34. Østgård LSG, Nørgaard JM, Sengeløv H, Severinsen M, Friis LS, Marcher CW, et al. Comorbidity and performance status in acute myeloid leukemia patients: a nation-wide

- population-based cohort study. *Leukemia*. 2015;29(3):548–55.
35. Carbonell ALI, de Lourdes Chauffaille M. Limitations of performance status assessment in elderly with acute myeloid leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* [Internet]. 2015;37(4):259–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjhh.2015.03.007>
 36. Grimwade D, Hills RK, Moorman A V, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* [Internet]. 2010 Jul 22;116(3):354–65. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/116/3/354/27618/Refinement-of-cytogenetic-classification-in-acute>
 37. Sangle NA, Perkins SL. Core-binding factor acute myeloid leukemia. *Arch Pathol Lab Med*. 2011;135(11):1504–9.
 38. De Braekeleer E, Douet-Guilbert N, De Braekeleer M. RARA fusion genes in acute promyelocytic leukemia: A review. *Expert Rev Hematol*. 2014;7(3):347–57.
 39. Adès L, Guerci A, Raffoux E, Sanz M, Chevallier P, Lapan S, et al. Very long-term outcome of acute promyelocytic leukemia after treatment with all-trans retinoic acid and chemotherapy: The European APL Group experience. *Blood*. 2010;115(9):1690–6.
 40. Muntean AG, Hess JL. The pathogenesis of mixed-lineage leukemia. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2012;7(4):283–301.
 41. Zhou MH, Yang QM. NUP214 fusion genes in acute leukemia (Review). *Oncol Lett*. 2014;8(3):959–62.
 42. Welch JS, Ley TJ, Link DC, Miller CA, Larson DE, Koboldt DC, et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell*. 2012;150(2):264–78.
 43. Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 2012;481(7382):506–10.
 44. Vosberg S, Greif PA. Clonal evolution of acute myeloid leukemia from diagnosis to relapse. *Genes Chromosom Cancer*. 2019;58(12):839–49.
 45. Martignoles JA, Delhommeau F, Hirsch P. Genetic hierarchy of acute myeloid leukemia: From clonal hematopoiesis to molecular residual disease. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12).
 46. Döhner K, Paschka P, Döhner H. Akute myeloische Leukämie. *Internist*. 2015;56(4):354–63.
 47. Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, Chen WC, Joseph M, Gupta V, et al. Identification of pre-leukemic hematopoietic stem cells in acute leukemia. 2016;506(7488):328–33.
 48. Yang J, Schiffer CA. Genetic biomarkers in acute myeloid leukemia: Will the promise of improving treatment outcomes be realized? *Expert Rev Hematol*. 2012;5(4):395–407.
 49. Chou WC, Chou SC, Liu CY, Chen CY, Hou HA, Kuo YY, et al. TET2 mutation is an unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics. *Blood*. 2011;118(14):3803–10.
 50. Su L, Gao SJ, Tan YH, Lin H, Liu XL, Liu SS, et al. CSF3R mutations were associated with an unfavorable prognosis in patients with acute myeloid leukemia with CEBPA double mutations. *Ann Hematol*. 2019;98(7):1641–6.
 51. Daver N, Schlenk RF, Russell NH, Levis MJ. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia*. 2019;33(2):299–312.
 52. Perry M, Bertoli S, Rocher C, Hayette S, Ducastelle S, Barraco F, et al. FLT3-TKD Mutations Associated With NPM1 Mutations Define a Favorable-risk Group in

- Patients With Acute Myeloid Leukemia. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk* [Internet]. 2018;18(12):e545–50. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clml.2018.06.006>
53. Ishikawa Y, Kawashima N, Atsuta Y, Sugiura I, Sawa M, Dobashi N, et al. Prospective evaluation of prognostic impact of KIT mutations on acute myeloid leukemia with RUNX1-RUNX1T1 and CFBF-MYH11. *Blood Adv*. 2020;4(1):66–75.
 54. Advani AS, Rodriguez C, Jin T, Jawde RA, Saber W, Baz R, et al. Increased C-kit intensity is a poor prognostic factor for progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed AML. *Leuk Res*. 2008;32(6):913–8.
 55. Bacher U, Haferlach T, Schoch C, Kern W, Schnittger S. Implications of NRAS mutations in AML: A study of 2502 patients. *Blood*. 2006;107(10):3847–53.
 56. Wang S, Wu Z, Li T, Li Y, Wang W, Hao Q, et al. Mutational spectrum and prognosis in NRAS-mutated acute myeloid leukemia. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69194-6>
 57. Zhou JD, Yao DM, Li XX, Zhang TJ, Zhang W, Ma JC, et al. KRAS overexpression independent of RAS mutations confers an adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2017;8(39):66087–97.
 58. Alfayez M, Issa GC, Patel KP, Wang F, Wang X, Short NJ, et al. The Clinical impact of PTPN11 mutations in adults with acute myeloid leukemia. *Leukemia* [Internet]. 2021;35(3):691–700. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41375-020-0920-z>
 59. Gómez-Seguí I, Makishima H, Jerez A, Yoshida K, Przychodzen B, Miyano S, et al. Novel recurrent mutations in the RAS-like GTP-binding gene RIT1 in myeloid malignancies. *Leukemia*. 2013;27(9):1943–6.
 60. Prats-Martín C, Burillo-Sanz S, Morales-Camacho RM, Pérez-López O, Suito M, Vargas MT, et al. ASXL1 mutation as a surrogate marker in acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes and normal karyotype. *Cancer Med*. 2020;9(11):3637–46.
 61. Terada K, Yamaguchi H, Ueki T, Usuki K, Kobayashi Y, Tajika K, et al. Usefulness of BCOR gene mutation as a prognostic factor in acute myeloid leukemia with intermediate cytogenetic prognosis. *Genes Chromosom Cancer*. 2018;57(8):401–8.
 62. Fasan A, Haferlach C, Alpermann T, Jeromin S, Grossmann V, Eder C, et al. The role of different genetic subtypes of CEBPA mutated AML. *Leukemia*. 2014;28(4):794–803.
 63. Fasan A, Eder C, Haferlach C, Grossmann V, Kohlmann A, Dicker F, et al. GATA2 mutations are frequent in intermediate-risk karyotype AML with biallelic CEBPA mutations and are associated with favorable prognosis. *Leukemia*. 2013;27(2):482–5.
 64. Schnittger S, Dicker F, Kern W, Wendland N, Sundermann J, Alpermann T, et al. RUNX1 mutations are frequent in de novo AML with noncomplex karyotype and confer an unfavorable prognosis. *Blood* [Internet]. 2011 Feb 24;117(8):2348–57. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10428194.2016.1179296>
 65. Tsai CH, Hou HA, Tang JL, Kuo YY, Chiu YC, Lin CC, et al. Prognostic impacts and dynamic changes of cohesin complex gene mutations in de novo acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. 2017;7(12).
 66. Thol F, Bollin R, Gehlhaar M, Walter C, Dugas M, Suchanek KJ, et al. Mutations in the cohesin complex in acute myeloid leukemia: Clinical and prognostic implications. *Blood*. 2014;123(6):914–20.
 67. Van Vlierberghe P, Patel J, Abdel-Wahab O, Lobry C, Hedvat C V., Balbin M, et al. PHF6 mutations in adult acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2011;25(1):130–4.
 68. Kadia TM, Jain P, Ravandi F, Garcia-Manero G, Andreef M, Takahashi K, et al. TP53 mutations in newly diagnosed acute myeloid leukemia: Clinicomolecular

- characteristics, response to therapy, and outcomes. *Cancer* [Internet]. 2016 Nov 15;122(22):3484–91. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.30203>
69. Gaidzik VI, Schlenk RF, Moschny S, Becker A, Bullinger L, Corbacioglu A, et al. Prognostic impact of WT1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: A study of the German-Austrian AML Study Group. *Blood*. 2009;113(19):4505–11.
 70. Krauth MT, Alpermann T, Bacher U, Eder C, Dicker F, Ulke M, et al. WT1 mutations are secondary events in AML, show varying frequencies and impact on prognosis between genetic subgroups. *Leukemia*. 2015;29(3):660–7.
 71. Okafor IM, Okoroiwu HU. Expression of Evi-1 Gene in Leukaemia: Diagnostic and Prognostic Perspective. *Annu Res Rev Biol*. 2021;36(1):121–35.
 72. Bamopoulos SA, Batcha AMN, Jurinovic V, Rothenberg-Thurley M, Janke H, Ksienzyk B, et al. Clinical presentation and differential splicing of SRSF2, U2AF1 and SF3B1 mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* [Internet]. 2020;34(10):2621–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41375-020-0839-4>
 73. Sargin B, Choudhary C, Crosetto N, Schmidt MHH, Grundler R, Rensinghoff M, et al. Flt3-dependent transformation by inactivating c-Cbl mutations in AML. *Blood*. 2007;110(3):1004–12.
 74. Bazzichetto C, Conciatori F, Pallocca M, Falcone I, Fanciulli M, Cognetti F, et al. Pten as a prognostic/predictive biomarker in cancer: An unfulfilled promise? *Cancers* (Basel). 2019;11(4):1–22.
 75. Han C, Gao X, Li Y, Zhang J, Yang E, Zhang L, et al. Characteristics of Cohesin Mutation in Acute Myeloid Leukemia and Its Clinical Significance. *Front Oncol*. 2021;11(April):1–9.
 76. Zhou F, Chen B. Acute myeloid leukemia carrying ETV6 mutations: biologic and clinical features. *Hematology* [Internet]. 2018;23(9):608–12. Available from: <https://doi.org/10.1080/10245332.2018.1482051>
 77. Hitzler JK, Cheung J, Li Y, Scherer SW, Zipursky A. GATA1 mutations in transient leukemia and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Blood*. 2003;101(11):4301–4.
 78. Thol F, Suchanek KJ, Koenecke C, Stadler M, Platzbecker U, Thiede C, et al. SETBP1 mutation analysis in 944 patients with MDS and AML. *Leukemia*. 2013;27(10):2072–5.
 79. Mechaal A, Menif S, Abbes S, Safra I. EZH2, new diagnosis and prognosis marker in acute myeloid leukemia patients. *Adv Med Sci* [Internet]. 2019;64(2):395–401. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.advms.2019.07.002>
 80. Stasik S, Middeke JM, Kramer M, Röllig C, Krämer A, Scholl S, et al. EZH2 mutations and impact on clinical outcome: An analysis in 1,604 patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2020;105(5).
 81. Smith ML, Snaddon J, Neat M, Cambal-Parralles M, Arch R, Lister TA, et al. Mutation of BRAF is uncommon in AML FAB type M1 and M2. *Leukemia* [Internet]. 2003 Jan 3;17(1):274–5. Available from: <http://www.nature.com/articles/2402787>
 82. Noronha TR de, Mitne M, Chauffaille M de L. JAK2-mutated acute myeloid leukemia: comparison of next-generation sequencing (NGS) and single nucleotide polymorphism array (SNPa) findings between two cases. *Autops Case Reports* [Internet]. 2019;9(2). Available from: <http://www.autopsyandcasereports.org/article/doi/10.4322/acr.2018.084>
 83. Herold T, Rothenberg-Thurley M, Grunwald V V., Janke H, Goerlich D, Sauerland MC, et al. Validation and refinement of the revised 2017 European LeukemiaNet genetic risk stratification of acute myeloid leukemia. *Leukemia* [Internet].

- 2020;34(12):3161–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41375-020-0806-0>
84. Boissel N, Renneville A, Biggio V, Philippe N, Thomas X, Cayuela JM, et al. Prevalence, clinical profile, and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. *Blood*. 2005;106(10):3618–20.
 85. Brinda B, Khan I, Parkin B, Konig H. The rocky road to personalized medicine in acute myeloid leukaemia. *J Cell Mol Med*. 2018;22(3):1411–27.
 86. Fenwarth L, Thomas X, de Botton S, Duployez N, Bourhis JH, Lesieur A, et al. A personalized approach to guide allogeneic stem cell transplantation in younger adults with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2021;137(4):524–32.
 87. Rechkoblit O, Johnson RE, Buku A, Prakash L, Prakash S, Aggarwal AK. Structural insights into mutagenicity of anticancer nucleoside analog cytarabine during replication by DNA polymerase η . *Sci Rep [Internet]*. 2019;9(1):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-52703-7>
 88. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: Recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010;115(3):453–74.
 89. Zhang J, Gu Y, Chen B. Mechanisms of drug resistance in acute myeloid leukemia. *Onco Targets Ther*. 2019;12:1937–45.
 90. Farge T, Saland E, de Toni F, Aroua N, Hosseini M, Perry R, et al. Chemotherapy-resistant human acute myeloid leukemia cells are not enriched for leukemic stem cells but require oxidative metabolism. *Cancer Discov*. 2017;7(7):716–35.
 91. Aroua N, Boet E, Ghisi M, Nicolau-Travers M-L, Saland E, Gwilliam R, et al. Extracellular ATP and CD39 Activate cAMP-Mediated Mitochondrial Stress Response to Promote Cytarabine Resistance in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discov [Internet]*. 2020 Oct;10(10):1544–65. Available from: <http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/2159-8290.CD-19-1008>
 92. Tien HF, Tang JL, Tsay W, Liu MC, Lee FY, Wang CH, et al. Methylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndrome: It can be detected early at diagnosis or during disease progression and is highly associated with leukaemic transformation. *Br J Haematol*. 2001;112(1):148–54.
 93. Luppi M, Fabbiano F, Visani G, Martinelli G, Venditti A. Novel Agents for Acute Myeloid Leukemia. *Cancers (Basel) [Internet]*. 2018;10(11):429. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6694/10/11/429>
 94. Collins DM, Bossenmaier B, Kollmorgen G, Niederfellner G. Acquired resistance to antibody-drug conjugates. *Cancers (Basel)*. 2019;11(3):1–17.
 95. Benmebarek MR, Karches CH, Cadilha BL, Lesch S, Endres S, Kobold S. Killing mechanisms of chimeric antigen receptor (CAR) T cells. *Int J Mol Sci*. 2019;20(6).
 96. Pellegrino M, Del Bufalo F, De Angelis B, Quintarelli C, Caruana I, de Billy E. Manipulating the Metabolism to Improve the Efficacy of CAR T-Cell Immunotherapy. *Cells*. 2020;10(1):1–16.
 97. Cummins KD, Gill S. Will CAR T cell therapy have a role in AML? Promises and pitfalls. *Semin Hematol [Internet]*. 2019;56(2):155–63. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2018.08.008>
 98. Ben Khoud M, Ingegnere T, Quesnel B, Mitra S, Brinster C. Acute myeloid leukemia: Is it t time? *Cancers (Basel)*. 2021;13(10):1–20.
 99. Lam SSY, Leung AYH. Overcoming resistance to flt3 inhibitors in the treatment of flt3-mutated aml. *Int J Mol Sci*. 2020;21(4).
 100. Alvarez-Calderon F, Gregory MA, Pham-Danis C, DeRyckere D, Stevens BM, Zaberezhnyy V, et al. Tyrosine kinase inhibition in leukemia induces an altered

- metabolic state sensitive to mitochondrial perturbations. *Clin Cancer Res.* 2015;21(6):1360–72.
101. Gregory MA, D'Alessandro A, Alvarez-Calderon F, Kim J, Nemkov T, Adane B, et al. ATM/G6PD-driven redox metabolism promotes FLT3 inhibitor resistance in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 2016 Oct 25;113(43):E6669–78. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1603876113>
 102. Perl AE. The role of targeted therapy in the management of patients with AML. *Blood Adv.* 2017;1(24):2281–94.
 103. Wang F, Morita K, DiNardo CD, Furudate K, Tanaka T, Yan Y, et al. Leukemia stemness and co-occurring mutations drive resistance to IDH inhibitors in acute myeloid leukemia. *Lead contact. bioRxiv [Internet]*. 2020;2020.10.27.357111. Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.10.27.357111>
 104. Harding JJ, Lowery MA, Shih AH, Schvartzman JM, Hou S, Famulare C, et al. Isoform switching as a mechanism of acquired resistance to mutant isocitrate dehydrogenase inhibition. *Cancer Discov.* 2018;8(12):1540–6.
 105. Stuani L, Sabatier M, Saland E, Cognet G, Poupin N, Bosc C, et al. Mitochondrial metabolism supports resistance to IDH mutant inhibitors in acute myeloid leukemia. *J Exp Med.* 2021;218(5).
 106. Pollyea DA, Amaya M, Strati P, Konopleva MY. Venetoclax for AML: Changing the treatment paradigm. *Blood Adv.* 2019;3(24):4326–35.
 107. Nechiporuk T, Kurtz SE, Nikolova O, Liu T, Jones CL, D'alessandro A, et al. The TP53 apoptotic network is a primary mediator of resistance to BCL2 inhibition in AML cells. *Cancer Discov.* 2019;9(7):910–25.
 108. Konopleva MY. Mechanisms for resistance in AML insights into molecular pathways mediating resistance to venetoclax. *Best Pract Res Clin Haematol [Internet]*. 2021;34(1):101251. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.beha.2021.101251>
 109. Pei S, Pollyea DA, Gustafson A, Stevens BM, Minhajuddin M, Fu R, et al. Monocytic Subclones Confer Resistance to Venetoclax-Based Therapy in Acute Myeloid Leukemia Patients. *Cancer Discovery.* 2020. CD-19-0710.
 110. Jacque N, Ronchetti AM, Larrue C, Meunier G, Birsén R, Willems L, et al. Targeting glutaminolysis has antileukemic activity in acute myeloid leukemia and synergizes with BCL-2 inhibition. *Blood.* 2015;126(11):1346–56.
 111. Stevens BM, Jones CL, Pollyea DA, Culp-Hill R, D'Alessandro A, Winters A, et al. Fatty acid metabolism underlies venetoclax resistance in acute myeloid leukemia stem cells. *Nat Cancer.* 2020;1(12):1176–87.
 112. Sharon D, Cathelin S, Mirali S, Di Trani JM, Yanofsky DJ, Keon KA, et al. Inhibition of mitochondrial translation overcomes venetoclax resistance in AML through activation of the integrated stress response. *Sci Transl Med.* 2019;11(516):1–16.
 113. Škrtić M, Sriskanthadevan S, Jhas B, Gebbia M, Wang Z, Hurren R, et al. Inhibition of Mitochondrial Translation As a. 2012;20(5):674–88.
 114. Ward PS, Thompson CB. Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. *Cancer Cell.* 2012;21(3):297–308.
 115. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metab.* 2008;7(1):11–20.
 116. MacDonald JA, Fowle WH, Shin E, Woods DC. A method for freeze-fracture and scanning electron microscopy of isolated mitochondria. *MethodsX [Internet]*. 2018;5(May):593–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.05.006>
 117. Lackner LL. Shaping the dynamic mitochondrial network. *BMC Biol.* 2014;12:22–5.
 118. Bordi M, Nazio F, Campello S. The Close interconnection between mitochondrial

- dynamics and mitophagy in cancer. *Front Oncol.* 2017;7(May):1–9.
119. Varum S, Rodrigues AS, Moura MB, Momcilovic O, Easley IV CA, Ramalho-Santos J, et al. Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts. *PLoS One.* 2011;6(6).
 120. Papa L, Djedaini M, Hoffman R. Mitochondrial role in stemness and differentiation of hematopoietic stem cells. *Stem Cells Int.* 2019;2019.
 121. Pei S, Minhajuddin M, Adane B, Khan N, Stevens BM, Mack SC, et al. AMPK/FIS1-Mediated Mitophagy Is Required for Self-Renewal of Human AML Stem Cells. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2018 Jul;23(1):86-100.e6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S193459091830239X>
 122. Nakamura-Ishizu A, Ito K, Suda T. Hematopoietic Stem Cell Metabolism during Development and Aging. *Dev Cell* [Internet]. 2020;54(2):239–55. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.06.029>
 123. Takubo K, Goda N, Yamada W, Iriuchishima H, Ikeda E, Kubota Y, et al. Regulation of the HIF-1 α level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2010;7(3):391–402. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.020>
 124. Takubo K, Nagamatsu G, Kobayashi CI, Nakamura-Ishizu A, Kobayashi H, Ikeda E, et al. Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2013;12(1):49–61.
 125. Ansó E, Weinberg SE, Diebold LP, Thompson BJ, Malinge S, Schumacker PT, et al. The mitochondrial respiratory chain is essential for haematopoietic stem cell function. *Nat Cell Biol.* 2017;19(6):614–25.
 126. Sommerkamp P, Altamura S, Renders S, Narr A, Ladel L, Zeisberger P, et al. Differential Alternative Polyadenylation Landscapes Mediate Hematopoietic Stem Cell Activation and Regulate Glutamine Metabolism. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2020;26(5):722-738.e7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.03.003>
 127. Jang YY, Sharkis SJ. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood.* 2007;110(8):3056–63.
 128. Ito K, Suda T. Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(4):243–56.
 129. Lallemand-Breitenbach V, De Thé H. Hematopoietic stem cells burn fat to prevent exhaustion. *Cell Stem Cell.* 2012;11(4):447–9.
 130. Kratchmarov R, Viragova S, Kim MJ, Rothman NJ, Liu K, Reizis B, et al. Metabolic control of cell fate bifurcations in a hematopoietic progenitor population. *Immunol Cell Biol.* 2018;8:1–9.
 131. Chacko BK, Kramer PA, Ravi S, Johnson MS, Hardy RW, Ballinger SW, et al. Methods for defining distinct bioenergetic profiles in platelets, lymphocytes, monocytes, and neutrophils, and the oxidative burst from human blood. *Lab Investig* [Internet]. 2013;93(6):690–700. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.2013.53>
 132. Kramer PA, Ravi S, Chacko B, Johnson MS, Darley-Usmar VM. A review of the mitochondrial and glycolytic metabolism in human platelets and leukocytes: Implications for their use as bioenergetic biomarkers. *Redox Biol* [Internet]. 2014;2(1):206–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.026>
 133. Mortensen M, Ferguson DJP, Simon AK. Mitochondrial clearance by autophagy in developing erythrocytes: Clearly important, but just how much so? *Cell Cycle.* 2010;9(10):1901–6.
 134. Pence BD, Yarbrow JR. Aging impairs mitochondrial respiratory capacity in classical monocytes. *Exp Gerontol* [Internet]. 2018;108(April):112–7. Available from:

- <https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.04.008>
135. Pei S, Minhajuddin M, Adane B, Khan N, Stevens BM, Mack SC, et al. AMPK/FIS1-Mediated Mitophagy Is Required for Self-Renewal of Human AML Stem Cells. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2018;23(1):86-100.e6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.05.021>
 136. Laker RC, Drake JC, Wilson RJ, Lira VA, Lewellen BM, Ryall KA, et al. Ampk phosphorylation of Ulk1 is required for targeting of mitochondria to lysosomes in exercise-induced mitophagy. *Nat Commun* [Internet]. 2017;8(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-00520-9>
 137. Dennis MK, Field AS, Burai R, Ramesh C, Whitney K, Bologna CG, et al. AKT/FOXO Singaling Enforces Reversible Differentiation Blockade in Myeloid Leukemias. *Cell*. 2011;14627(5):358–66.
 138. Ferber EC, Peck B, Delpuech O, Bell GP, East P, Schulze A. FOXO3a regulates reactive oxygen metabolism by inhibiting mitochondrial gene expression. *Cell Death Differ*. 2012;19(6):968–79.
 139. Herst PM, Howman RA, Neeson PJ, Berridge M V., Ritchie DS. The level of glycolytic metabolism in acute myeloid leukemia blasts at diagnosis is prognostic for clinical outcome. *J Leukoc Biol*. 2011;89(1):51–5.
 140. Chen WL, Wang JH, Zhao AH, Xu X, Wang YH, Chen TL, et al. A distinct glucose metabolism signature of acute myeloid leukemia with prognostic value. *Blood*. 2014;124(10):1645–54.
 141. Ye H, Adane B, Khan N, Alexeev E, Nusbacher N, Minhajuddin M, et al. Subversion of Systemic Glucose Metabolism as a Mechanism to Support the Growth of Leukemia Cells. *Cancer Cell* [Internet]. 2018;34(4):659-673.e6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.08.016>
 142. Ju HQ, Zhan G, Huang A, Sun Y, Wen S, Yang J, et al. ITD mutation in FLT3 tyrosine kinase promotes Warburg effect and renders therapeutic sensitivity to glycolytic inhibition. *Leukemia*. 2017;31(10):2143–50.
 143. Saito Y, Sawa D, Kinoshita M, Yamada A, Kamimura S, Suekane A, et al. EVI1 triggers metabolic reprogramming associated with leukemogenesis and increases sensitivity to L-asparaginase. *Haematologica*. 2020;105(8):2118–29.
 144. Stuani L, Riols F, Millard P, Sabatier M, Batut A, Saland E, et al. Stable Isotope Labeling Highlights Enhanced Fatty Acid and Lipid Metabolism in Human Acute Myeloid Leukemia. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11):3325.
 145. Wang L, Yang L, Yang Z, Tang Y, Tao Y, Zhan Q, et al. Glycolytic enzyme PKM2 mediates autophagic activation to promote cell survival in NPM1-mutated leukemia. *Int J Biol Sci*. 2019;15(4):882–94.
 146. Song K, Li M, Xu XJ, Xuan L, Huang GN, Song XL, et al. HIF-1a and GLUT1 gene expression is associated with chemoresistance of acute myeloid leukemia. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2014;15(4):1823–9.
 147. Sun LY, Li XJ, Sun YM, Huang W, Fang K, Han C, et al. LncRNA ANRIL regulates AML development through modulating the glucose metabolism pathway of AdipoR1/AMPK/SIRT1. *Mol Cancer*. 2018;17(1):1–6.
 148. Chen W-L, Wang Y-Y, Zhao A, Xia L, Xie G, Su M, et al. Enhanced Fructose Utilization Mediated by SLC2A5 Is a Unique Metabolic Feature of Acute Myeloid Leukemia with Therapeutic Potential. *Cancer Cell* [Internet]. 2016 Nov;30(5):779–91. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S153561081630441X>
 149. Kreitz, Schönfeld, Seibert, Stolp, Alshamleh, Oellerich, et al. Metabolic Plasticity of Acute Myeloid Leukemia. *Cells* [Internet]. 2019;8(8):805. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/8/805>

150. Petersen C, Nielsen MD, Andersen ES, Basse AL, Isidor MS, Markussen LK, et al. MCT1 and MCT4 Expression and Lactate Flux Activity Increase during White and Brown Adipogenesis and Impact Adipocyte Metabolism. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–13.
151. Saulle E, Spinello I, Quaranta MT, Pasquini L, Pelosi E, Iorio E, et al. Targeting Lactate Metabolism by Inhibiting MCT1 or MCT4 Impairs Leukemic Cell Proliferation, Induces Two Different Related Death-Pathways and Increases Chemotherapeutic Sensitivity of Acute Myeloid Leukemia Cells. *Front Oncol.* 2021;10(February):1–16.
152. Ambrosio ALB, Moraes I, Ascensão CFR, de Oliveira JF, Girard RMBM, Dias SMG, et al. Human mitochondrial pyruvate carrier 2 as an autonomous membrane transporter. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–13.
153. Reed MAC, Ludwig C, Bunce CM, Khanim FL, Günther UL. Malonate as a ROS product is associated with pyruvate carboxylase activity in acute myeloid leukaemia cells. *Cancer Metab [Internet].* 2016;4(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40170-016-0155-7>
154. Patel MS, Korotchkina LG. The biochemistry of the pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem Mol Biol Educ.* 2003;31(1):5–15.
155. Park S, Jeon JH, Min BK, Ha CM, Thoudam T, Park BY, et al. Role of the pyruvate dehydrogenase complex in metabolic remodeling: Differential pyruvate dehydrogenase complex functions in metabolism. *Diabetes Metab J.* 2018;42(4):270–81.
156. Qin L, Wang J, Deng W, Tian Y, Yu Z, Chen Y, et al. Targeting PDK1 with dichloroacetophenone to inhibit acute myeloid leukemia (AML) cell growth. *Oncotarget [Internet].* 2015;7(2):1395–407. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26593251> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4811468>
157. Cui L, Cheng Z, Liu Y, Dai Y, Pang Y, Jiao Y, et al. Overexpression of PDK2 and PDK3 reflects poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Cancer Gene Ther [Internet].* 2020;27(1–2):15–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41417-018-0071-9>
158. Matre P, Velez J, Jacamo R, Qi Y, Su X, Cai T, et al. Inhibiting glutaminase in acute myeloid leukemia: metabolic dependency of selected AML subtypes. *Oncotarget.* 2016;7(48).
159. Hattori A, Tsunoda M, Konuma T, Kobayashi M, Nagy T, Glushka J, et al. Cancer progression by reprogrammed BCAA metabolism in myeloid leukaemia. *Nature [Internet].* 2017;545(7655):500–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature22314>
160. Barve, Vega, Shah, Ghare, Casson, Wunderlich, et al. Perturbation of Methionine/S-adenosylmethionine Metabolism as a Novel Vulnerability in MLL Rearranged Leukemia. *Cells [Internet].* 2019 Oct 25;8(11):1322. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/11/1322>
161. Jones CL, Stevens BM, D'Alessandro A, Reisz JA, Culp-Hill R, Nemkov T, et al. Inhibition of Amino Acid Metabolism Selectively Targets Human Leukemia Stem Cells. *Cancer Cell [Internet].* 2018;34(5):724-740.e4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.10.005>
162. Des Rosiers C, Labarthe F, Lloyd SG, Chatham JC. Cardiac anaplerosis in health and disease: Food for thought. *Cardiovasc Res.* 2011;90(2):210–9.
163. Samudio I, Harmancey R, Fiegl M, Kantarjian H, Konopleva M, Korchin B, et al. Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *J Clin Invest.* 2010;120(1):142–56.
164. Lee EA, Angka L, Rota SG, Hanlon T, Mitchell A, Hurren R, et al. Targeting mitochondria with avocatin B induces selective leukemia cell death. *Cancer Res.*

- 2015;75(12):2478–88.
165. Tabe Y, Saitoh K, Yang H, Sekihara K, Yamatani K, Ruvolo V, et al. Inhibition of FAO in AML co-cultured with BM adipocytes: mechanisms of survival and chemosensitization to cytarabine. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–12.
 166. Shafat MS, Oellerich T, Mohr S, Robinson SD, Edwards DR, Marlein CR, et al. Leukemic blasts program bone marrow adipocytes to generate a protumoral microenvironment. 2019;129(10):1320–33.
 167. Guitart A V., Panagopoulou TI, Villacreces A, Vukovic M, Sepulveda C, Allen L, et al. Fumarate hydratase is a critical metabolic regulator of hematopoietic stem cell functions. *J Exp Med*. 2017;jem.20161087.
 168. Germain N, Dessein A-F, Vienne J-C, Dobbelaere D, Mention K, Joncquel M, et al. First-line Screening of OXPHOS Deficiencies Using Microscale Oxygraphy in Human Skin Fibroblasts: A Preliminary Study. *Int J Med Sci [Internet]*. 2019;16(7):931–8. Available from: <http://www.medsci.org/v16p0931.htm>
 169. Kim EM, Jung CH, Song JY, Park JK, Um HD. Pro-apoptotic Bax promotes mesenchymal-epithelial transition by binding to respiratory complex-I and antagonizing the malignant actions of pro-survival Bcl-2 proteins. *Cancer Lett [Internet]*. 2018;424(April):127–35. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.03.033>
 170. Kluza J, Jendoubi M, Ballot C, Dammak A, Jonneaux A, Idziorek T, et al. Exploiting mitochondrial dysfunction for effective elimination of imatinib-resistant leukemic cells. *PLoS One*. 2011;6(7):1–14.
 171. Sriskanthadevan S, Jeyaraju D V, Chung TE, Prabha S, Xu W, Skrtic M, et al. MYELOID NEOPLASIA AML cells have low spare reserve capacity in their respiratory chain that renders them susceptible to oxidative metabolic stress. 2017;125(13):2120–31.
 172. Ashton TM, McKenna WG, Kunz-Schughart LA, Higgins GS. Oxidative phosphorylation as an emerging target in cancer therapy. *Clin Cancer Res [Internet]*. 2018;49(0):clincanres.3070.2017. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29420223> <http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-17-3070>
 173. Baccelli I, Gareau Y, Lehnertz B, Gingras S, Spinella JF, Corneau S, et al. Mubritinib Targets the Electron Transport Chain Complex I and Reveals the Landscape of OXPHOS Dependency in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell*. 2019;36(1):84-99.e8.
 174. Kluckova K, Bezawork-Geleta A, Rohlena J, Dong L, Neuzil J. Mitochondrial complex II, a novel target for anti-cancer agents. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg [Internet]*. 2013;1827(5):552–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.10.015>
 175. Murai M, Miyoshi H. Current topics on inhibitors of respiratory complex i. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg [Internet]*. 2016;1857(7):884–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.11.009>
 176. Huang CW, Lin KM, Hung TY, Chuang YC, Wu SN. Multiple Actions of Rotenone, an Inhibitor of Mitochondrial Respiratory Chain, on Ionic Currents and Miniature End-Plate Potential in Mouse Hippocampal (mHippoE-14) Neurons. *Cell Physiol Biochem*. 2018;47(1):330–43.
 177. Bezawork-Geleta A, Rohlena J, Dong L, Pacak K, Neuzil J. Mitochondrial Complex II: At the Crossroads. *Trends Biochem Sci [Internet]*. 2017;42(4):312–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2017.01.003>
 178. Klimova T, Chandel NS. Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF. *Cell Death Differ*. 2008;15(4):660–6.
 179. Li-shar H, David C, Eric Y T, Edward A B. Binding of the respiratory chain inhibitor

- antimycin to the mitochondrial bc1 complex: a new crystal structure reveals an altered hydrogen-bonding pattern. *J Mol Biol.* 2005;351(3):573–97.
180. Davoudi M, Kallijärvi J, Marjavaara S, Kotarsky H, Hansson E, Levéen P, et al. A mouse model of mitochondrial complex III dysfunction induced by myxothiazol. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2014;446(4):1079–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.03.058>
 181. Kadenbach B. Complex IV – The regulatory center of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Mitochondrion* [Internet]. 2021;58:296–302. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.10.004>
 182. Leavesley HB, Li L, Prabhakaran K, Borowitz JL, Isom GE. Interaction of cyanide and nitric oxide with cytochrome c oxidase: Implications for acute cyanide toxicity. *Toxicol Sci.* 2008;101(1):101–11.
 183. Sun RC, Board PG, Blackburn AC. Targeting metabolism with arsenic trioxide and dichloroacetate in breast cancer cells. *Mol Cancer* [Internet]. 2011;10(1):142. Available from: <http://www.molecular-cancer.com/content/10/1/142>
 184. Lañg E, Grudic A, Pankiv S, Bruslerud Ø, Simonsen A, Bjerkvig R, et al. The arsenic-based cure of acute promyelocytic leukemia promotes cytoplasmic sequestration of PML and PML/RARA through inhibition of PML body recycling. *Blood.* 2012;120(4):847–57.
 185. Walker JE. The ATP synthase: The understood, the uncertain and the unknown. *Biochem Soc Trans.* 2013;41(1):1–16.
 186. Gao YQ, Yang W, Karplus M. A structure-based model for the synthesis and hydrolysis of ATP by F₁-ATPase. *Cell.* 2005;123(2):195–205.
 187. Grover GJ, Atwal KS, Sleph PG, Wang FL, Monshizadegan H, Monticello T, et al. Excessive ATP hydrolysis in ischemic myocardium by mitochondrial F₁F₀-ATPase: Effect of selective pharmacological inhibition of mitochondrial ATPase hydrolase activity. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2004;287(4 56-4):1747–55.
 188. Hearne A, Chen H, Monarchino A, Wiseman JS. Oligomycin-induced proton uncoupling. *Toxicol Vitro.* 2020;67(June).
 189. Wu S, Akhtari M, Alachkar H. Characterization of Mutations in the Mitochondrial Encoded Electron Transport Chain Complexes in Acute Myeloid Leukemia. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-31489-0>
 190. Schagger H. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 2000;19(8):1777–83.
 191. Acín-Pérez R, Fernández-Silva P, Peleato ML, Pérez-Martos A, Enriquez JA. Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Mol Cell.* 2008;32(4):529–39.
 192. Davies KM, Strauss M, Daum B, Kief JH, Osiewacz HD, Rycovska A, et al. Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(34):14121–6.
 193. Guo R, Gu J, Zong S, Wu M, Yang M. Structure and mechanism of mitochondrial electron transport chain. *Biomed J* [Internet]. 2018;41(1):9–20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bj.2017.12.001>
 194. Enríquez JA. Supramolecular Organization of Respiratory Complexes. *Annu Rev Physiol.* 2016;78(1):533–61.
 195. Mirali S, Aaron B, Voisin V, Xu C, St-Germain J, Sharon D, et al. The Mitochondrial Protease, Neurolysin (NLN), Regulates Respiratory Chain Complex and Supercomplex Formation and Is Necessary for AML Viability. *Blood.* 2019;134(Supplement_1):729–729.
 196. Jastroch M, Divakaruni AS, Mookerjee S, Treberg JR, Brand MD. Mitochondrial

- proton and electron leaks. *Essays Biochem.* 2010;47:53–67.
197. Marchetti P, Fovez Q, Germain N, Khamari R, Kluza J. Mitochondrial spare respiratory capacity: Mechanisms, regulation, and significance in non-transformed and cancer cells. *FASEB J.* 2020;(June):1–19.
 198. Shih CP, Lee JT, Chen HK, Lin YC, Chen HC, Lin YY, et al. Comparison of changes in mitochondrial bioenergetics between keratinocytes in human external auditory canal skin and cholesteatomas from normoxia to hypoxia. *Sci Rep [Internet].* 2018;8(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-18536-y>
 199. Momcilovic M, Jones A, Bailey ST, Waldmann CM, Li R, Lee JT, et al. In vivo imaging of mitochondrial membrane potential in non-small-cell lung cancer. *Nature [Internet].* 2019;575(7782):380–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1715-0>
 200. André F, Corazao-Rozas P, Idziorek T, Quesnel B, Kluza J, Marchetti P. GILZ overexpression attenuates endoplasmic reticulum stress-mediated cell death via the activation of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun [Internet].* 2016;478(2):513–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.07.053>
 201. Farge T, Saland E, de Toni F, Aroua N, Hosseini M, Perry R, et al. Chemotherapy-resistant human acute myeloid leukemia cells are not enriched for leukemic stem cells but require oxidative metabolism. *Cancer Discov.* 2017;7(7):716–35.
 202. Wei Y, Jiao Y, An D, Li D, Li W, Wei Q. Review of dissolved oxygen detection technology: From laboratory analysis to online intelligent detection. *Sensors (Switzerland).* 2019;19(18).
 203. Wu M, Neilson A, Swift AL, Moran R, Tamagnine J, Parslow D, et al. Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2007;292(1):125–36.
 204. Nelson MAM, McLaughlin KL, Hagen JT, Coalson HS, Schmidt C, Kassai M, et al. Intrinsic oxphos limitations underlie cellular bioenergetics in leukemia. *Elife.* 2021;10.
 205. Azzaoui I, Yahia SA, Chang Y, Vorng H, Morales O, Fan Y, et al. CCL18 differentiates dendritic cells in tolerogenic cells able to prime regulatory T cells in healthy subjects. *Blood.* 2011;118(13):3549–58.
 206. Grievink HW, Luisman T, Kluft C, Moerland M, Malone KE. Comparison of Three Isolation Techniques for Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Cell Recovery and Viability, Population Composition, and Cell Functionality. *Biopreserv Biobank.* 2016;14(5):410–5.
 207. Mookerjee SA, Goncalves RLS, Gerencser AA, Nicholls DG, Brand MD. The contributions of respiration and glycolysis to extracellular acid production. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg [Internet].* 2015;1847(2):171–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.10.005>
 208. Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. *Cancer.* 2006;107(9):2099–107.
 209. Desler C, Hansen TL, Frederiksen JB, Marcker ML, Singh KK, Juel Rasmussen L. Is there a link between mitochondrial reserve respiratory capacity and aging? *J Aging Res.* 2012;2012.
 210. Rossi A, Rigotto G, Valente G, Giorgio V, Basso E, Filadi R, et al. Defective Mitochondrial Pyruvate Flux Affects Cell Bioenergetics in Alzheimer's Disease-Related Models. *Cell Rep [Internet].* 2020;30(7):2332–2348.e10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.060>
 211. O. Warburg. On the Origin of Cancer Cells. *Science (80-).* 1956;123(3191):309–14.

212. Bouchez CL, Hammad N, Cuvellier S, Ransac S, Rigoulet M, Devin A. The Warburg Effect in Yeast: Repression of Mitochondrial Metabolism Is Not a Prerequisite to Promote Cell Proliferation. *Front Oncol.* 2020;10(August):1–15.
213. Song X, Peng Y, Wang X, Chen Y, Jin L, Yang T, et al. Incidence, Survival, and Risk Factors for Adults with Acute Myeloid Leukemia Not Otherwise Specified and Acute Myeloid Leukemia with Recurrent Genetic Abnormalities: Analysis of the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Database, 2001-2013. *Acta Haematol.* 2018;139(2):115–27.
214. Huang R, Liao X, Li J, Wei J, Su X, Lai X, et al. Genome-scale integrated analysis to identify prospective molecular mechanisms and therapeutic targets in isocitrate dehydrogenase 2 R140Q-mutated acute myeloid leukemia. *Oncol Rep.* 2019;41(5):2876–88.
215. Trinh A, Khamari R, Fovez Q, Mahon FX, Turcq B, Bouscary D, Maboudou P, Joncquel M, Coiteux V, Germain N, Laine W, Dekiok S, Ghesquiere B, Idziorek T, Quesnel B, Kluza J MP. Antimetabolic cooperativity with the clinically approved kidrolase and tyrosine kinase inhibitors to eradicate cml stem cells. 2020;21(1):1–9.
216. Bosc C, Gadaud N, Bousard A, Sabatier M, Saland E, Farge T, et al. Mitochondrial determinants of response and resistance to venetoclax. 2020;
217. El Achi H, Kanagal-Shamanna R. Biomarkers in Acute Myeloid Leukemia: Leveraging Next Generation Sequencing Data for Optimal Therapeutic Strategies. *Front Oncol.* 2021;11(September):1–13.
218. Morita K, Wang F, Jahn K, Hu T, Tanaka T, Sasaki Y, et al. Clonal evolution of acute myeloid leukemia revealed by high-throughput single-cell genomics. *Nat Commun [Internet].* 2020;11(1):1–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-19119-8>
219. Marchetti P, Guerreschi P, Mortier L, Kluza J. Integration of Mitochondrial Targeting for Molecular Cancer Therapeutics. *Int J Cell Biol.* 2015;2015(Figure 1).
220. Panina SB, Pei J, Baran N, Konopleva M, Kirienko N V. Utilizing Synergistic Potential of Mitochondria-Targeting Drugs for Leukemia Therapy. *Front Oncol.* 2020;10(April).
221. Willems L, Jacque N, Jacquet A, Neveux N, Maciel TT, Lambert M, et al. Inhibiting Glutamine uptake represents an attractive new strategy for treating acute myeloid leukemia. *Blood.* 2013;122(20):3521–32.
222. Gerstung M, Papaemmanuil E, Martincorena I, Bullinger L, Verena I, Paschka P, et al. Knowledge Bank Approach. 2018;49(3):332–40.
223. Molina JR, Sun Y, Protopopova M, Gera S, Bandi M, Bristow C, et al. An inhibitor of oxidative phosphorylation exploits cancer vulnerability. *Nat Med [Internet].* 2018;24(7):1036–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-018-0052-4>
224. Chen X, Glytsou C, Zhou H, Narang S, Reyna DE, Lopez A, et al. Targeting mitochondrial structure sensitizes acute myeloid Leukemia to venetoclax treatment. *Cancer Discov.* 2019;9(7):890–909.
225. Farge T, Saland E, de Toni F, Aroua N, Hosseini M, Perry R, et al. Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. *Cancer Discov [Internet].* 2017 Jul;7(7):716–35. Available from: <http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/2159-8290.CD-16-0441>
226. Vazquez R, Breal C, Zalmai L, Friedrich C, Almire C, Contejean A, et al. Venetoclax combination therapy induces deep AML remission with eradication of leukemic stem cells and remodeling of clonal haematopoiesis. *Blood Cancer J [Internet].* 2021;11(3):4–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41408-021-00448-w>
227. Stevens BM, O'Brien C, Jordan CT, Jones CL. Enriching for human acute myeloid

- leukemia stem cells using reactive oxygen species-based cell sorting. *STAR Protoc* [Internet]. 2021;2(1):100248. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100248>
228. Wang YH, Israelsen WJ, Lee D, Yu VWC, Jeanson NT, Clish CB, et al. Cell-state-specific metabolic dependency in hematopoiesis and leukemogenesis. *Cell* [Internet]. 2014;158(6):1309–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.048>
229. Østgård LSG, Medeiros BC, Sengeløv H, Nørgaard M, Andersen MK, Dufva I, et al. Epidemiology and clinical significance of secondary and therapy-related acute myeloid leukemia: A national population-based cohort study. *J Clin Oncol*. 2015;33(31):3641–9.
230. André F, Trinh A, Balayssac S, Maboudou P, Dekiouk S, Malet-Martino M, et al. Metabolic rewiring in cancer cells overexpressing the glucocorticoid-induced leucine zipper protein (GILZ): Activation of mitochondrial oxidative phosphorylation and sensitization to oxidative cell death induced by mitochondrial targeted drugs. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2017;85:166–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2017.02.011>
231. Liu D, Lai HT, Peyre F, Brenner C. Multiple analysis of mitochondrial metabolism, autophagy and cell death [Internet]. 1st ed. Vol. 164, *Methods in Cell Biology*. Elsevier Inc.; 2021. 95–112 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.mcb.2021.02.001>
232. Wu J, Xiao Y, Sun J, Sun H, Chen H, Zhu Y, et al. A single-cell survey of cellular hierarchy in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*. 2020;13(1):1–19.
233. Düssmann H, Perez-Alvarez S, Anilkumar U, Papkovsky DB, Prehn JH. Single-cell time-lapse imaging of intracellular O₂ in response to metabolic inhibition and mitochondrial cytochrome-c release. *Cell Death Dis* [Internet]. 2017;8(6):e2853. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2017.247>
234. Vo TT, Ryan J, Carrasco R, Neuberg D, Rossi DJ, Stone RM, et al. Relative mitochondrial priming of myeloblasts and normal HSCs determines chemotherapeutic success in AML. *Cell* [Internet]. 2012;151(2):344–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.038>
235. Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J*. 2011;435(2):297–312.

Annexes

Annexe 1 : Revue - Mitochondrial spare respiratory capacity: Mechanisms, regulation, and significance in non-transformed and cancer cells

REVIEW

Mitochondrial spare respiratory capacity: Mechanisms, regulation, and significance in non-transformed and cancer cells

Philippe Marchetti^{1,2} | Quentin Fovez¹ | Nicolas Germain^{1,2} | Raeesa Khamari¹ | Jérôme Kluza¹

¹Institut de Recherche contre le Cancer de Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, UMR9020 – UMR-S 1277 – Canther, Université Lille, Lille Cedex, France

²Banque de Tissus, CHU Lille, Lille Cedex, France

Correspondence

Philippe Marchetti, Institut de Recherche contre le Cancer de Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, UMR9020 – UMR-S 1277 – Canther, Université Lille, 1, place Verdun, F-59045 Lille Cedex, France.

Email: philippe.marchetti@inserm.fr

Funding information

Ligue Contre le Cancer, Grant/Award Number: 001ARB; Region Haut de France

Abstract

Mitochondrial metabolism must constantly adapt to stress conditions in order to maintain bioenergetic levels related to cellular functions. This absence of proper adaptation can be seen in a wide array of conditions, including cancer. Metabolic adaptation calls on mitochondrial function and draws on the mitochondrial reserve to meet increasing needs. Among mitochondrial respiratory parameters, the spare respiratory capacity (SRC) represents a particularly robust functional parameter to evaluate mitochondrial reserve. We provide an overview of potential SRC mechanisms and regulation with a focus on its particular significance in cancer cells.

KEYWORDS

mitochondrial adaptation, mitochondrial dysfunction, mitochondrial flexibility, mitochondrial metabolism, mitochondrial stress, oxygen consumption, respiratory reserve capacity, spare reserve capacity, uncoupling ratio

1 | INTRODUCTION

In almost all eukaryotic cells, mitochondrion is at the center of the metabolic network. In the mitochondrial matrix, various substrates, including glucose-derived pyruvate, amino-acid glutamine as well as fatty acids, can be alternately oxidized to support ATP production and/or macromolecule synthesis. In non-transformed cells maintained under aerobic conditions, most of the ATP is synthesized in the mitochondria through oxidative phosphorylation. Energetic substrates are oxidized in the tricarboxylic acid cycle that provides electrons to the electron transport chain complexes of the inner mitochondrial membrane. The electron flux between

complexes creates an electrochemical proton gradient across the inner mitochondrial membrane. Then, the proton gradient powers the ATP synthase to phosphorylate ADP to ATP.

Mitochondrial metabolism is integrated into the dynamic context of cell functions. Generally, mitochondrial respiration operates at the basal level, sufficient for daily routine use such as maintaining protein turnover and ion homeostasis. Depending on cellular conditions, the energy needs to go up and down regularly, thus requiring a fine regulation of ATP production to avoid fruitless energy outlay and to perfectly match cellular needs. To enable energetic adaptation, the respiration rate is tightly controlled by ATP demand and when required, mitochondrial respiration can abruptly increase to the maximum level to synthesize more ATP. Interestingly, the

Abbreviations: 4-HNE, 4-hydroxy-2-nonenal; AML, acute myeloid leukemia; AMPK, AMP-dependent Kinase; BHT, butylated hydroxytoluene; BNIP3, BH3-only protein Bcl-2-like 19kDa-interacting protein 3; CPT-1, carnitine palmitoyltransferase-1; DNP, 2, 4-dinitrophenol; ETC, electron transport chain; FAO, fatty acid oxidation; FCCP, carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazine; JAK, Janus Kinase; MFN2, mitofusin 2; MITF, melanocyte inducing transcription factor; MPC, mitochondrial pyruvate carrier; MTCH2, mitochondrial carrier homolog 2; Nox4, NADPH-oxidase 4; OCR, oxygen consumption rate; PDH, pyruvate dehydrogenase; PINK1, PTEN-induced putative kinase 1; PKM2, M2 isoform of pyruvate kinase; SDHA, succinate dehydrogenase A; SRC, spare respiratory capacity; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3; TFAM, mitochondrial transcription factor A.

basal level represents a variable portion of the maximal respiratory capacity, which depends on the cell type. For example, it has been observed that hepatocytes only use approximately

30% of their maximal respiratory capacity to maintain basal respiration.¹ The difference between basal respiration and respiration at its maximal level constitutes the mitochondrial

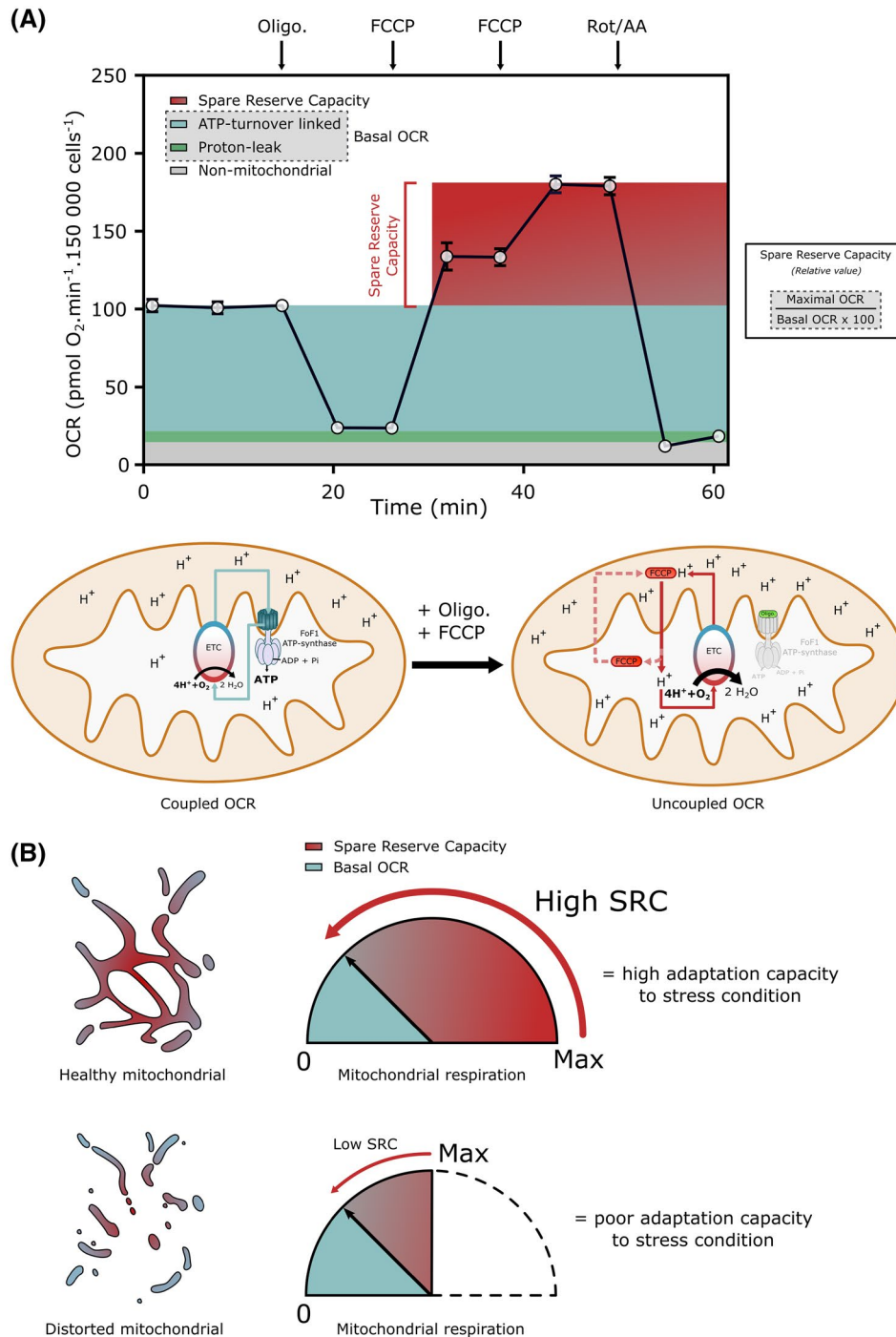


FIGURE 1 A, upper part Schematic representation of mitochondrial respiratory parameters obtained after the determination of the oxygen consumption rate (OCR) values using the Seahorse XFe24. The spare respiratory capacity is determined after oligomycin and FCCP injections. Relative value of spare respiratory capacity was determined by this calculation: Maximal OCR / (Basal OCR *100); lower part Schematic representation of mitochondrial respiratory chain function before (coupled state) and after oligomycin and FCCP (uncoupled state). FCCP allows the re-entry of protons inside mitochondria short-circuiting ATP-synthase. Oligomycin inhibits ATP-synthase preventing its reverse operation; B, Schematic representation of mitochondrial health: cells with high spare respiratory capacity levels have higher adaptability to stress conditions unlike cells with low spare respiratory capacity levels

reserve (Figure 1). Various terms are used such as uncoupling control ratio,² mitochondrial reserve capacity³ or mitochondrial spare respiratory capacity.⁴ The latter “spare respiratory capacity” (SRC) will be used throughout the review. Mitochondria functioning is a highly dynamic process and cells can mobilize SRC when needed. Thus, SRC characterizes the mitochondrial capacity to meet extra energy requirements, beyond the basal level, in response to acute cellular stress or heavy workload and thereby avoiding an ATP crisis.² SRC can be viewed as a determination of mitochondrial fitness, a reflection of “healthy” mitochondria¹ (Figure 1). Endurance training and caloric restrictions can improve SRC levels. Thus, it could be strikingly relevant to determine SRC as a marker of mitochondrial fitness in the “oxidative tissues” requiring the greatest amount of energy such as heart, brain or muscles.

Besides, SRC levels correlate with the degree of mitochondrial plasticity allowing bio-energetic adaptability in response to pathophysiological stress conditions.⁵ Inadequate SRC levels are associated with pathological conditions. Low SRC levels can correspond to mitochondrial dysfunction invisible under basal conditions but unveiled only when the respiration rate is close to its upper limit.³ SRC depletion has been associated with several cardiovascular and neurological chronic diseases. Indeed, the SRC level is insufficient to produce the required energy, stressed cells are subjected to an ATP crisis, suffer, and then are at risk of cell death.² Furthermore, recent evidence shows that mitochondrial reserve could also play an important role in cancer cell metabolism (see below). Indeed, it has been established that glycolysis is not the unique metabolic phenotype for cancer cells and that mitochondrial metabolism can provide the energy and anabolic needs for oncogenesis, metastatic development and the onset of cancer drug resistance.

Overall, SRC constitutes an important parameter participating in the dynamics of metabolic pathways involved in cell proliferation, differentiation, and death, affecting both non-transformed cells and cancer cells. Among mitochondrial parameters, SRC has a clear advantage because of its low variability and high sensitivity.⁴ Clinical studies have shown that SRC is an internally normalized parameter that is reproducible, and potentially relevant in determining mitochondrial adaptation.

In this review, we will discuss emerging notions on mitochondrial respiratory reserve capacity. In particular, we will address the following questions:

1. How can SRC be routinely assessed?
2. How is SRC maintained in a cellular context?
3. What is the role and significance of SRC in non-transformed cells and cancer cells?

2 | METHOD TO DETECT SPARE RESPIRATORY CAPACITY

Commonly, mitochondrial respiratory reserve capacity is determined by oximetry. SRC value is obtained by subtracting basal respiration from maximal oxygen consumption obtained by the titration of exposure to uncoupling agents such as carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) (Figure 1). FCCP is a protonophore allowing the rapid translocation of protons across the inner mitochondrial membrane diverting the proton flux from FoF1-ATP synthase. As a consequence of this uncoupling effect, the response to FCCP exposure leads to a sharp and abrupt increase in oxygen consumption to preserve the proton gradient.⁶ Thus, SRC is mobilized to offset the proton leak triggered by FCCP.

From a practical point of view, it is essential to refine the optimal FCCP doses leading to uncontrolled respiration without inducing cell death.⁷ One should note that FCCP concentration needs further dose optimization studies. Optimal FCCP doses to obtain SRC depend on experimental parameters such as temperature⁸ and excessive uncoupling promotes ROS-dependent cell death and eventually energetic crisis.⁹ Because optimal doses can vary according to the different experimental conditions, it is better to do sequential additions of uncouplers to achieve maximal rate (Figure 1).

Alternatively, mild uncouplers such as 2, 4-dinitrophenol (DNP), butylated hydroxytoluene (BHT) or Bam15 can be used.^{10,11} One drawback of this evaluation method is that FCCP or other uncouplers artificially mimic energy requirements, which are not physiologically regulated.¹² Usually, SRC is determined by the presence of oligomycin A, ie, the ATP synthase inhibitor (Figure 1). Thus, commonly SRC evaluation determines the maximum respiratory capacity without depending on ATP synthase (Figure 1). To this extent, the measure of the SRC level is more indicative of conditions where respiration offsets the proton leak than the maximum respiration required to produce ATP. Moreover, inhibiting ATP synthase can prevent the reverse operation of FoF1-ATPase, allowing the exit of protons into the intermembrane space at the expense of ATP.¹³ The addition of oligomycin may also limit ATP-dependent processes that supply oxidative pathways. Consequently, the presence of oligomycin results in an important underestimation of the maximal respiration and therefore of SRC, evaluated between 25% and 45%.¹⁴ Finally, in interpreting SRC, one must keep in mind that these experimental conditions exclude any influence of the control of O₂ consumption by proton cycling and oxidative phosphorylation.

It is clearly established that mitochondria show modified functional activity when isolated. Consequently, SRC determination should be always performed in intact cells. Over isolated mitochondria, this condition provides the advantage

of being more representative of the state of mitochondria in vivo, since the interactions of mitochondria with the rest of the cell such as the energetic pathways are preserved. Technological advances using real-time analysis of oxygen consumption offer the opportunity to determine the SRC level accurately in intact cell culture models (Figure 1).

3 | MECHANISMS CONTRIBUTING TO THE MAINTENANCE OF THE SPARE RESPIRATORY CAPACITY

SRC depends on multiple parameters including the integrity of the electron transport chain and of the inner mitochondrial membrane, the mitochondrial ability to oxidize energetic substrates as well as the preservation of mitochondrial homeostasis (Figure 2).

3.1 | SRC depends on the integrity of the mitochondrial electron transport chain and of proton permeability of the inner mitochondrial membrane

In different cell types, the SRC is conditioned by the activity of respiratory chain components. An increase in the expression of complex I through the LIF/STAT3 pathway supports high SRC levels in pluripotent mouse embryonic stem cells.⁶

In complex I deficient fibroblasts, succinate delivery increases SRC,¹² suggesting the possibility that the activity of complex II may substitute the activity of complex I for SRC maintenance. In certain cell types such as cardiomyocytes, the activity of complex II is predominant for SRC maintenance even in the presence of fully functional complex I. Thus, the inhibition of the complex II subunit, succinate dehydrogenase A (SDHA), abrogates SRC without disrupting the basal respiration rate.¹⁰ In line with this, selective interaction and inhibition of SDHA with the mitochondrial chaperone, TRAP1 also extinguishes SRC in tumor cells.¹¹ Depending on the cell type, SRC is not only limited by the level of activity in complexes I and II. Thus, in myeloid leukemia cells, the constitutive weak enzymatic activity of complex III is responsible for low SRC levels in comparison to normal peripheral mononuclear cells.¹³ Furthermore, it has also been observed that the alteration of complex IV enzymatic activity by oxidation can lead to a drop in SRC levels in cardiomyocytes under stress conditions.¹⁴ Finally, it was reported that the assembly of respiratory chain components in larger structures, such as the respiratory supercomplexes that enhance the catalytic activity of complexes, contributes to maintaining high SRC levels.⁶

To sum up, depending on cell type status,⁷ each mitochondrial respiratory complex as well as supercomplexes can be implicated as primary targets of SRC regulation.

Proton permeability of the inner mitochondrial membrane is a key SRC determinant. The mitochondrial inner membrane possesses a low permeability to protons, in particular, due to

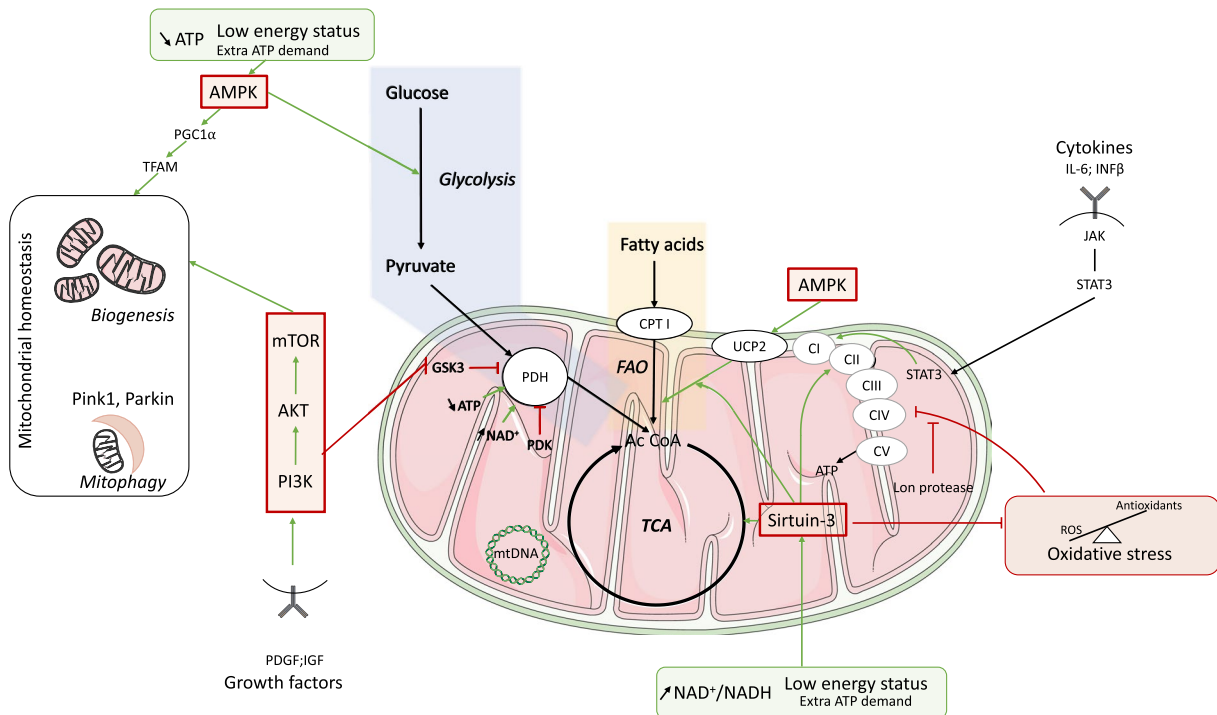


FIGURE 2 Schematic representation of factors influencing the level of spare respiratory capacity. The spare respiratory capacity mainly depends on electron transport chain function, substrate availability and mitochondrial biogenesis regulated by upstream sensors (see text for details)

the presence of the essential phospholipid cardiolipin. This lipid composition is essential for the formation of the proton gradient, which is required for ATP synthesis. Consequently, the integrity of the inner mitochondrial membrane is essential to sustain high SRC levels. Thus, reduction in the cardiolipin content decreases SRC levels.⁸ In line with this, mild uncoupling resulting in a moderate increase in proton permeability leading to a reduction in ROS production without affecting ATP levels could decrease SRC levels, probably by increasing basal respiration.^{8,9}

3.2 | SRC depends on the availability of mitochondrial substrates and on TCA cycle activity

SRC can be regulated upstream from ETC activities.¹⁰ Indeed, SRC is influenced by the flow and nature of nutrients that can be oxidized in the mitochondrial matrix by the TCA cycle. Substrate oxidization in mitochondria is cell- and context-specific. Depending on cell type and conditions, SRC depends on the oxidation of two major energetic substrates such as glucose-derived pyruvate or fatty acids.

Generally, cells use pyruvate to maintain mitochondrial SRC. Pyruvate comes from the multi-step degradation of glucose into the cytosol (ie, glycolysis). After glycolysis, upon entering the mitochondrial matrix through the mitochondrial pyruvate carrier (MPC), pyruvate is then oxidized into Acetyl-CoA to serve as a respiratory substrate to produce ATP. Mitochondrial oxidation of pyruvate is critically regulated by the pyruvate dehydrogenase (PDH) multi-enzyme complex. In the event of low energy levels, eg, due to an additional demand for ATP, the activation of pyruvate production and its mitochondrial oxidation enables the cell to mobilize SRC. There is widespread evidence for the involvement of glycolysis-derived pyruvate oxidation in the maintenance of SRC levels. This is particularly true for certain cancer cells characterized by a high glycolytic rate. Thus, in hepatocarcinoma, the genetic depletion of hexokinase 2 inhibits glycolysis-derived pyruvate production and concurrently abolishes SRC.¹⁵ Likewise, cancer cells cultured with the monosaccharide sugar galactose to replace glucose have lower SRC levels than cells in regular glucose medium.⁵ Genetic¹⁶ or pharmacological¹⁷ inhibition of the mitochondrial pyruvate carrier (MPC), a transporter conducting pyruvate across the mitochondrial inner membrane to the matrix, abolishes SRC in different cancer cell types. Consequently, the pharmacological inhibition of MPC by UK5099 decreases SRC in many cell types.^{17,18} Besides, blockage of pyruvate utilization in mitochondria via decreased pyruvate dehydrogenase (PDH) activity (the rate-limiting enzyme in pyruvate oxidation), extinguishes SRC.¹⁰ Low SRC levels are correlated with decreased PDH activity due to the activation of the HIF-1 α /PDH

kinase axis.¹⁰ In addition, it was demonstrated that hypoxic conditions (<0.1% O₂ for 24 hours), redirecting the pyruvate flux from mitochondrial oxidation to lactate, depletes SRC levels (60%-100% decrease).¹⁰ Conversely, the restoration of the pyruvate flux into the mitochondrial matrix via the knock-out of LDH A isoform, key enzyme degrading the pyruvate into lactate, induces a significant increase in SRC levels, more than sixfold.¹⁹ Likewise, PDH activation with the PDK inhibitor DCA, does not always modify basal oxygen consumption but results in a significant increase in SRC levels.¹⁰ Similarly, the increase in mitochondrial pyruvate oxidation through UCP2 overexpression stimulates SRC.²⁰ Furthermore, the addition of growing concentrations of pyruvate in the culture medium displays a dose-dependent SRC increase in cancer cells.²¹ Cardiomyocytes cultured in medium with pyruvate as the sole substrate demonstrated SRC levels threefold higher than those in cells cultured in glucose medium.²²

Pyruvate is not the only mitochondrial substrate supporting SRC. Mitochondria of hematopoietic cells preferentially oxidize fatty acids to sustain SRC. Platelet SRC is critically dependent on the activity of carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1) regulating an essential step of mitochondrial fatty acid oxidation (FAO).²³ Moreover, the oxidation of exogenous fatty acids seems critical for SRC in the long-term survival of hematopoietic cells. High levels of FAO maintain high SRC in long-lived T cells,²⁴ in long-lasting TcR-stimulated T cells receiving PD-1 signaling²⁵ or in tolerogenic dendritic cells.²⁶

Neonatal myocytes, unlike human induced-pluripotent stem cell-derived cardiac myocytes, require the synergistic activity of glucose and palmitate to maintain SRC whereas glucose alone is sufficient to support their basal respiration.¹⁰

These results suggest that basal respiration and SRC can rely on different sets of nutrients and that these two parameters possess different regulatory pathways depending on the cellular context.

3.3 | SRC depends on mitochondrial homeostasis

It is well established that cells have complex mechanisms capable of controlling mitochondrial quality and quantity. Mitochondrial homeostasis is ensured through coordinated processes including mitochondrial biogenesis and specific elimination of defective mitochondria called mitophagy. These mitochondrial quality control mechanisms regulate SRC levels. It was observed that increased mitochondrial biogenesis leads to a parallel increase in SRC levels.²⁷ This situation often occurs in response to external stimuli such as exercise or caloric restrictions. PGC1 α is the main regulator of signaling pathways involved in mitochondrial biogenesis. Activation of PGC1 α -dependent biogenesis has been

observed in a subset of melanomas with high SRC levels.^{28,29} The transcription factor, STAT-3, which promotes mitochondrial transcription in stem cells also enhances SRC.⁶ Conversely, knock-down of the mitochondrial transcription factor A (TFAM) strikingly reduces SRC levels.³⁰

Mitophagy is a backup process for selective removal of damaged dysfunctional mitochondria. Dysfunctional mitochondria are then replaced by the biogenesis of new mitochondria. Therefore, in increasing the quality of mitochondria, mitophagy participates in maintaining SRC levels. Thus, alterations in the PINK/PARKIN-dependent mitophagy, a situation characteristic of familial Parkinson's disease, lead to a severe decline in SRC levels.^{31,32} However, excessive mitophagy without a concomitant increase in mitochondrial biogenesis induces SRC depletion. Cardiomyocytes overexpressing BNIP3, a potent inducer of mitophagy in cardiac myocytes, reduce SRC levels without affecting basal respiration.³³

Altogether, the data above indicate that SRC depends on multiple mitochondrial parameters and that SRC variations render it impossible to identify a specific regulation mechanism, yet SRC determination does provide a synthetic view of the bioenergetic metabolism.

4 | MOLECULAR REGULATION OF SPARE RESPIRATORY CAPACITY LEVELS

SRC levels are critically regulated by cellular signals coming from inside and outside mitochondria. As summarized in Figure 2, numerous complementary signals converge to regulate SRC levels. Those that modify the efficiency of the ETC and/or mitochondrial substrates are involved in short-term mitochondrial plasticity whereas variations of mitochondrial biogenesis are considered long-term regulators. In line with this, several drugs modulating mitochondrial physiology can experimentally impact SRC levels (Table 1).

4.1 | Post-translational regulation of the ETC proteins

Post-translational mechanisms regulating SRC levels were described. The intra-mitochondrial Lon protease is a key actor of mitochondrial integrity acting as a chaperone of misfolded mitochondrial proteins. Thus, it is not surprising that Lon protease is involved in maintaining adequate mitochondrial function and providing adequate SRC levels. Particularly, Lon protease is involved in the degradation of oxidized mitochondrial proteins.³⁴ Lon protease targets proteins that are highly vulnerable to oxidative damage and require renewal to support effective mitochondrial function. Thus, cells with mutated Lon protease are characterized by low SRC levels³⁵

due to the maintenance of damaged, oxidized dysfunctional mitochondria. Another mechanism to regulate SRC levels depends on the mitochondrial NAD-dependent deacetylase Sirtuin-3.¹⁰ Sirtuin-3 is activated by high NAD⁺ levels, triggered by low cellular energy status. Via its robust deacetylase activity, Sirtuin-3 targets key enzymes that control mitochondrial oxidation. Sirtuin-3 regulates the activity of enzymes involved in fatty acid oxidation and in the respiratory chain required for SRC maintenance. Thus, Sirtuin-3 maintains SRC levels in cardiomyocytes¹⁰ through the deacetylation of the 13-lysine acetylation site of SDHA, resulting in its increased enzymatic activity.³⁶ Moreover, Sirtuin-3 can regulate the oxidative balance through an increased activity of the antioxidant enzyme, SOD2, and thereby can upregulate the SRC levels (see below). All these post-translational modifications orchestrate activities of major mitochondrial oxidative enzymes and play key roles in SRC regulation.

4.2 | Metabolic sensors

AMP-dependent kinase (AMPK) is a serine/threonine kinase which represents a key energy sensor. When ATP levels are low, the ADP:AMP ratio increases and in turn activates AMPK. AMPK activation is responsible for adapting cellular metabolism to restore energy and thereby contributing to SRC maintenance. Pharmacologically, AMPK agonists gradually increase SRC levels.³⁷ Activation of the AMPK-PPAR α pathway, favors FAO, and increases SRC levels in cardiomyocytes.¹⁰ Interestingly, AMPK activation also results in increased expression of several factors involved in mitochondrial biogenesis and function, including PGC-1 α , Tfam, and UCP2.³⁸ Hyperglycemia reduces SRC levels³⁹ probably through the downregulation of the AMPK/PGC1 α axis,⁴⁰ suggesting an adaptive response in mitochondrial respiration in order to cope with nutrient overload.

4.3 | Redox regulation

Oxidative stress significantly reduces SRC via several distinct mechanisms.⁴¹ The redox effect on SRC may be reversible or irreversible depending on the intensity of the oxidative stress.⁴² Reactive oxygen and nitrogen species exposure at low concentrations have a minimum impact on basal respiration but both treatments reversibly affect SRC, probably as a result of the ETC protein modification, like S-thiolation.⁴³ Furthermore, protein S-glutathiolation induced by diamide triggers a reversible mitochondrial response consisting of increased proton leak and down-regulation of SRC.⁴⁴ NADPH-oxidase 4 (Nox4), a constitutively active enzyme produces H₂O₂, inhibits SRC although it is not clear whether this inhibitory effect depends on the ROS generation or on the

TABLE 1 Various drugs affecting SRC in non-transformed and cancer cells

Drugs	Drug Targets	Resulting effects on OXPHOS	Resulting effects on SRC	Models	Reference
Securinine	AML differentiation agent	↘↘↘ Maximal OCR ↘ Basal OCR	Decrease SRC through inhibition of the redox mediator thioredoxin reductase	AML cell lines	104
Venetoclax	BH3 mimetic, selective small-molecule antagonist of the anti-apoptotic protein BCL-2	↘↘↘ Maximal OCR ↘ Basal OCR	Decrease SRC	Tested in combination with azacytidine in leukemia stem cells isolated from AML patients	105,106
Gamitrinib	Mitochondrial HSP 90 inhibitor	↘↘ Maximal OCR ↘↘ Basal OCR	Decrease SRC probably via Inhibition of mitochondrial biogenesis and bioenergetics	Tested alone or in combination with BRAF inhibitor in melanoma cell lines in vitro	107
MAPK inhibitors	Mutated BRAF and/or MEK	↗↗↗ Maximal OCR ↗ Basal OCR	Increase SRC through stimulation of mitochondrial biogenesis	BRAF mutated cell lines	107,108
Akt inhibitors (perifosine)		↘ Maximal OCR - Basal OCR	Decrease SRC without effect on basal respiration	NSCLC cell lines	109
L-Asparaginase	Depletion of extracellular asparagine and glutamine	↘↘↘ Maximal OCR ↘ Basal OCR	Decrease SRC	Childhood ALL	110
Amla	AMPK and Nrf2 activation	↗↗↗ Maximal OCR ↗ Basal OCR	Enhance SRC	C2C12 myotubes, murine skeletal muscle	27
Docosahexaenoic acid	Alteration of HIF-1 α -associated metabolism	↘↘↘ Maximal OCR ↘↘↘ Basal OCR	Decrease SRC through inhibition of glucose uptake and oxidation	Mammary carcinoma cell lines	111
Dichloroacetate	PDK inhibition	- Maximal OCR ↗↗↗ Basal OCR	Drawing on SRC	Glioblastoma cell lines	112
H ₂ O ₂ /Menadione	Pro-oxidative drugs	↘↘↘ Maximal OCR - Basal OCR	Deplete SRC	Pancreatic acinar cell	41
UK5099	MPC inhibition	↘↘↘ Maximal OCR ↘ Basal OCR	Deplete SRC	Androgen receptor-driven prostate cancer	17

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

Drugs	Drug Targets	Resulting effects on OXPHOS	Resulting effects on SRC	Models	Reference
Resveratrol	Elevate adenosine monophosphate activated protein kinase levels, enhanced neurite outgrowth and normalized mitochondrial inner membrane polarization in axons	↗↗↗ Maximal OCR - Basal OCR	Enhance SRC	Sensory neurons cultured from streptozotocin-diabetic rats	40
AICAR	Enhanced the expression of Ppar α , peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha (Pgc-1 α), and Cpt1	↗↗↗ Maximal OCR ↗ Basal OCR	Enhance SRC	Neonatal rat cardiac myocytes	10
Bezafibrate	Agonist of PGC-1 α /PPAR complexes	↗ Maximal OCR ↗ Basal OCR	Enhance SRC	CD8+ T cells from MC38-bearing mice were treated with anti-PD-L1 and bezafibrate	113
Honokiol	Disrupts mitochondrial respiration by affecting complexes I, II, and V	↘↘ Maximal OCR ↘↘ Basal OCR	Decrease SRC	Melanoma cell lines	114
Etomoxir	CPT-1 inhibition	↘↘↘ Maximal OCR - Basal OCR	Deplete SRC	HepG2 cell line	115

NRF2-dependent control of mitochondrial biogenesis.⁴⁵ In line with this, the genetic ablation of the mitochondrial antioxidant-detoxifying enzyme SOD2 also reduces SRC levels.^{46,47} Oxidized lipids were shown to lower SRC thus contributing to myocyte death.⁴⁸ Among the products resulting from lipid peroxidation, 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) represents one of the most bioactive compounds produced in mitochondria. 4-HNE forms covalent adducts with functional groups in nucleic acids, membrane lipids, and proteins. Mitochondrial protein-4-HNE adducts can affect ETC proteins such as cytochrome c oxidase. Their presence increases ATP-linked respiration but abolishes SRC eventually leading to bioenergetics collapse and cardiomyocyte death⁴⁸ occurring in the heart after ischemia or pressure overload.⁴² Conversely, the mitochondrial isoenzyme aldehyde dehydrogenase-2, which detoxifies endogenous 4-HNE, significantly increases SRC levels.⁴⁹

4.4 | Signaling pathways

For years, it was admitted that the regulation of metabolic pathways operated independently from signal transduction pathways that drive key cell functions. Recently, a large body of evidence emerged to support the interplay between signaling pathways induced by the growth factor and cytokines and

the regulation of metabolic pathways including mitochondrial metabolism. The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway is the major SRC regulator in non-transformed cells. In hepatocytes, incubation with IGF-1 that activates the PI3K/AKT pathway elicits a significant increase in SRC as well as upregulating glycolysis. The knock-out of PTEN, a negative regulator of the PI3K/AKT pathway, shows higher SRC and glycolysis than in control cells.⁵⁰ Activation of the PI3K/AKT signaling cascade upon incubation with growth factors such as PDGF,⁵¹ G-CSF⁵² or IGF-1⁵³ also results in a dose-dependent increase in SRC levels. SRC upregulation is inhibited by the pre-incubation with the inhibitor of the PI3K/AKT pathway, LY 294002.⁵³ Likewise, pharmacological inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway results in significantly reduced SRC levels in cortical neurons.⁵⁴ There are several possible explanations for the PI3K/AKT/mTOR-dependent increase in SRC levels. Activation of PI3K/AKT/mTOR can enhance (i) the mitochondrial mass and/or the expression of specific ETC proteins; eg, it has been demonstrated that mTOR upregulates the transcriptional regulators of mitochondrial biogenesis including PGC1- α ⁵⁵ and the expression of nuclear-encoded components of complex I⁵⁵; (ii) the activity of critical enzymes (Complex I, III, IV) of the ETC^{50,56}; or (iii) the pyruvate utilization. Activation of PI3K/AKT could increase the glycolytic flux and pyruvate oxidation in mitochondria. Thus, this effect on SRC could be

attributed to the Akt-mediated inhibition of GSK3 β , a critical PDH inhibitor. As a result, pyruvate is fully oxidized into the mitochondrial matrix to sustain high SRC levels.⁵⁰ Besides, it was recently demonstrated that mTOR favors the interaction between the M2 isoform of pyruvate kinase (PKM2) with mitofusin 2 (MFN2) via the mTOR-dependent phosphorylation of MFN2.⁵⁷ This leads to a metabolic shift from glycolysis to mitochondrial OXPHOS with a concomitant boost of SRC levels (up to a threefold increase).

Another important signaling pathway triggered by cytokines has been involved in the regulation of SRC levels. Cytokines activate Janus Kinases (JAK) that phosphorylate STAT proteins, which translocate to the nucleus to upregulate the expression of acute-phase genes. Cytokine-activated JAK/STAT signaling pathway has also been involved in the regulation of the metabolism in several cell types.⁵⁸ Interestingly, a non-classical effect of STAT distinct from its classical role as a nuclear transcription factor was described. Indeed, a small pool of phosphorylated (phospho-S727) STAT3 proteins was located within the mitochondrial matrix where it activates mitochondrial oxidation including SRC and ATP production. Most studies unveiled that the presence of mitochondrial STAT3 increased the activity of mitochondrial complexes I and II, in a concentration-dependent manner.⁵⁹ Although the precise mechanism remains unknown, it has been suggested that STAT-3 could interact with and stabilize specific electron transport complexes. Thus, upon IL-6 exposure mitochondrial STAT3 could facilitate the formation of super-complexes as well as Complex I activity in the super-complexes.⁶⁰ Alternatively, it was reported that with cytokine leukemia inhibitory factor (LIF) stimulation, mitochondrial STAT3 specifically upregulates the transcription of mitochondrial genes encoding several components of complex I in ES cells consistent with a direct transcription of mtDNA.⁶

Finally, the activation of the MAPK pathway has also been involved in the regulation of SRC levels in cancer, which will be detailed in the next chapter (see below).

The aforementioned studies highlight the complex interactions between key signaling pathways responsible for SRC regulation and underline the need for strict requirements to interpret SRC within a cell-specific context.

5 | SRC DETERMINATION IN NON-TRANSFORMED CELLS

5.1 | SRC levels are heterogeneous in non-transformed cells under physiological conditions

SRC levels are highly heterogeneous among non-transformed cells,⁷ and strictly dependent on cell physiology.¹⁸ For

example, in blood cells, SRC levels are higher increased in monocytes and lymphocytes; whereas in platelets, SRC levels are close to basal values and only reach 20% of the maximal mitochondrial respiration.⁶¹ This difference in SRC levels might be related to the various numbers of functional mitochondria among blood cell types. Heterogeneity SRC levels were also observed between neuronal subpopulations coming from different brain regions. Midbrain dopaminergic neurons that are intrinsically subjected to oxidative stress via the activation of biochemical dopamine biosynthetic pathways exhibit low SRC levels compared to other neuron populations.⁶² Likewise, cortical astrocytes present with SRC levels 1.5 times higher than basal respiration values whereas in cortical neurons SRC levels are three times higher than the basal value⁶³ highlighting the absolute need to take into account the cellular context when interpreting SRC values. In line with this, tissues with the lowest SRC levels are also the most sensitive to mitochondrial targeting drugs. This finding explains why the striatum is the region most sensitive to pesticide complex I inhibitors such as rotenone, a form of injury leading to Parkinson's disease.⁶⁴

Regardless of these considerations, significant changes in SRC levels can be correlated with certain physiological circumstances including the differentiation process, aging, and the immune response. In these conditions, SRC levels reflect more on cell physiology rather than mitochondrial dysfunction.

5.1.1 | SRC levels in proliferative vs differentiated cells

It is observed that cells presenting with low SRC levels (less than 1.5-2 times basal respiration values) are generally proliferative cells. This is true for cancer cells (see below) but also for some proliferative non-transformed cells such as myoblasts.⁶³ One can assume that proliferative cells intensively draw on the mitochondrial reserve to respond to biosynthetic needs for cell replication.⁶³

Conversely, high SRC levels (more than 1.5-2 times basal respiration values) characterize highly differentiated post-mitotic cells and particularly differentiated cells with important ATP needs like cardiomyocytes or hepatocytes.¹ Thus, primary hepatocytes and adult cardiomyocytes present SRC levels 3.5 and 2 times higher than their basal levels, respectively.¹ Relatively lower SRC levels in cardiomyocytes may seem paradoxical since these cells are regarded as having one of the highest energy requirements. However, it can be assumed that high levels of basal respiration for beating cardiomyocyte reduce SRC values.

Interestingly, during the differentiation process, the SRC level increases gradually from stem cells to the mature differentiated cells preferably in the terminal phase of cell

differentiation. Thus, in comparison, post-mitotic differentiated cells have higher SRC levels than stem cells or iPS cells⁶⁵ even when they have low resting requirements. Cortical neuronal differentiation was associated with a progressive increase in PGC1 α - and TFAM-dependent mitochondrial biogenesis, also depending on the activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway. An increase in SRC levels was evidenced at the later stages of neuronal differentiation corresponding to dendritic outgrowth and maturation,⁵⁴ and at the later stages of neuronal differentiation corresponding to dendritic outgrowth and maturation. The multi-step process of adipogenesis constitutes another example of a gradual increase in SRC levels during differentiation. Adipocyte differentiation is accompanied by a metabolic switch from glycolytic metabolism toward mitochondrial oxidative phosphorylation. During differentiation, cells of the adipogenic lineage gradually develop high SRC levels (up to a sixfold increase between preadipocytes and mature adipocytes) allowing for a rapid adaptation to metabolic changes such as hypoglycemic conditions.⁶⁶ The increase in SRC levels during differentiation could be explained by the upregulation of mitochondrial biogenesis⁶⁷ and/or Mfn-2-dependent mitochondrial dynamics⁶⁸ encountered during the terminal differentiation processes. However, an increase in SRC levels is strictly dependent on the cellular context and may not always be observed. Thus, unlike adipocyte differentiation, the differentiation of mesenchymal stem cells into chondrocytes is not accompanied by SRC activation. Indeed, during chondrogenesis, the mitochondrial network is gradually fragmenting and associated with the excessive elimination of mitochondria by mitophagy. These effects tend to mitigate the magnitude of SRC.⁶⁸

5.1.2 | SRC level and aging

It seems that the aging process greatly deteriorates the mitochondrial structure and function. A cohort study of skin fibroblasts from 55 individuals of different ages, revealed that SRC levels were sharply reduced for donors over 61 years of age with 20% of downregulation.⁶⁹ Mechanisms involved in age-related mitochondrial dysfunction are complex and remain elusive. It is known that, in comparison to the nuclear genome, mtDNA is more susceptible to the age-related accumulation of mutations and deletions. Age-related deterioration of mtDNA can thus affect numerous components of the ETC and potentially also SRC level. Mechanisms of age-related SRC reduction cannot be limited to mtDNA alterations. In an *in vitro* aging model using the CRISPR-Cas9 strategy to remove telomeres, an 80% decrease in SRC levels was observed in neuronal cells.⁷⁰ This effect could be attributed to a deficiency in PARKIN-dependent mitophagy. Oxidative tissues such as the brain, heart, and skeletal muscles are subject to age-related mitochondrial dysfunction and

negative SRC regulation. Once again, these mechanisms are probably multifactorial, and for that reason, changes in SRC levels are highly variable and subjected to interindividual variability (for review 71). However, one can speculate that SRC reduction linked to the aging process could participate in an increased incidence of age-related cardiovascular and neurological diseases.

5.1.3 | SRC level and the immune response and long-lived cells

SRC levels change in T cells throughout the immune response and different T cell subpopulations have a distinct metabolic profile.⁷² Among CD4+ T cells, effector T cells require glycolysis to proliferate, differentiate and survive whereas regulatory T cells rely on mitochondrial FAO thereby regulatory T cell subpopulation has higher SRC levels than effector T cells.⁷³ Long-lived CD8+ memory T cells display predominant mitochondrial metabolism in comparison to naive or effector T cells and therefore possess high SRC levels.^{24,74} CD8+ memory T cells have weak glycolytic rates and instead oxidize fatty acid to support the TCA cycle and SRC levels. CD8+ memory T cells with high SRC levels are also characterized by the IL-15 stimulated mitochondrial biogenesis.⁷⁵ In addition, there is a close link between mitochondrial metabolism and the immune response. Enforced mitochondrial fusion allows CD8+ T cells to adopt a memory phenotype characterized by high SRC levels.⁷⁶ Interestingly, the increase in PGC1 α -dependent mitochondrial biogenesis in CD8+ T cells results in the improvement of their effector cytokine function, suggesting that SRC value could be seen as an indicator of the effector immune function.

Like T cells, other immune cells involved in the immune response depend on mitochondrial metabolism to keep them alive or maintain their functions. Interestingly, Toll-like receptor agonists activate dendritic cells resulting in a significant increase in the glycolysis-dependent SRC levels allowing these cells to adapt to the energetic needs for cell-cell communication, cytokines secretion, and migration.⁷⁷ Likewise, long-term plasma B cells possess high SRC levels.¹⁸ It has been suggested that high SRC constitutes a bioenergetic advantage that allows immune cells to respond more rapidly and effectively during reinfection.⁷⁸ Thus, SRC determination could be interesting to identify long-term survival for effective immune cell subpopulations.

5.2 | SRC levels and pathophysiological conditions in non-transformed cells

SRC depletion has been associated with several pathological conditions occurring in tissues with high energy requirements

(for review 71). Thus, neurodegenerative and cardiovascular diseases cause multiple cellular stresses that gradually affect SRC. A notable feature is that the SRC collapse observed in these contexts generally results from breaching the maximal respiratory capacity without major alteration to the basal respiratory level.

5.2.1 | Neurodegenerative diseases and SRC

It has been evaluated that 50% of the ATP produced by neuron mitochondria is dedicated to the maintenance of transmembrane ion fluxes and nearly 30% to synaptic transmission, indicating that synaptic mitochondria are crucial for proper neuronal function. For that reason, SRC depletion may play a crucial role in the pathogenesis of neurological diseases including several neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), and amyotrophic lateral sclerosis. In a mouse model of AD, hippocampal neurons exhibit drastic SRC deficiency (twofold lower compared to controls). This mitochondrial dysfunction precedes the onset of histological signs, suggesting its role as a causal factor of the disease.⁷⁹ SRC determines the degree of neuronal susceptibility to cellular stress induced by hypoxia, nutrient shortage or excitatory neurotransmitters. In that respect, overactivation of the N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR), a cationic channel gated by the neurotransmitter glutamate, is associated with synaptic dysfunction and has been involved in the wide range of acute and chronic neurologic diseases. Notably, the chronic activation of NMDAR considerably increases ATP requirements forcing neurons to use their SRC as cells attempt to recover initial ATP levels. Consequently, NMDAR overactivation severely decreases the available SRC.^{9,80} SRC depletion in neurodegenerative diseases often results from the complex interplay of multiple mechanisms. Among the possible mechanisms responsible for the mitochondrial bioenergetic deficit, the following were described (i) maintenance of dysfunctional mitochondria by default of physiological mitophagy in certain forms of PD characterized by mutations in Parkin, Pink or DJ-1⁶²; (ii) predominant role of the oxidative stress in the progression of diseases including amyotrophic lateral sclerosis; (iii) or reduced expression and activity of ETC enzymes.⁷¹ All these mechanisms contribute to some extent to the SRC exhaustion observed in neurological diseases.

5.2.2 | Cardiovascular diseases and SRC

The human heart consumes more energy per gram of tissue than any other organ, which represents 6kg ATP every

day, mainly produced by mitochondria. The mitochondrial addiction to heart tissues explains why mitochondrial alterations have been associated with severe heart disease. In the hypertrophic heart, the volume overload leads to a twofold increase in ATP consumption requiring the SRC to compensate. Decompensation of the heart occurs when there is an imbalance between energy use and energy production.

Cardiac mitochondria in failing hearts exhibit ultrastructural abnormalities with increased matrix and disorganized cristae⁸¹ even in patients without major clinical symptoms. In a preclinical model of heart failure, SRC deficits were observed resulting in a hypertrophic heart.⁸² The proposed mechanisms of bioenergetic exhaustion encompass impaired ETC complex, alteration of FAO, oxidative stress as well as defects in TFAM and PGC-1 α -dependent mitochondrial biogenesis.⁷¹ Interestingly, all these modifications affecting SRC precede the onset of heart failure, suggesting the need to maintain high SRC levels as a treatment approach.

5.3 | Consequences of SRC reduction in non-transformed cells

SRC is not required for basal physiological conditions but becomes essential in acute stress conditions resulting in a sharp increase in energy demand. Cells with greater SRC needs can potentially generate more ATP if needed, to better cope under stress conditions including energetic and oxidative stress.³⁵ SRC is then used to combat the deleterious effects of stress. Accordingly, SRC levels were positively correlated with enhanced fibroblast survival.⁸¹ SRC was described as a mechanism of neuronal protection against excitotoxicity.^{4,15} In addition, SRC enhancement via Complex II is correlated with resistance to hypoxia-induced cardiac cell death.²⁰ When the reserve is consumed and falls below a certain threshold, the cell can no longer compensate for the deleterious effects of stress (see Figure 3). In this case, the drastic reduction in the SRC level observed in pathological conditions reflects the incapacity of mitochondria to respond to supra-energetic demand. This situation is often associated with cell dysfunction culminating in cell death. Cell death in this context is primarily induced by an "energetic crisis". In many studies, SRC loss was predictive of the onset of cell death or organ dysfunction. As previously mentioned, it was demonstrated that a large variety of pathological situations decrease SRC levels, leading to the heart or neuronal cell death when depleted. Cell death by SRC depletion also occurs in skeletal muscles. The mitochondrial DNA mutator mice, a mouse model that results in SRC exhaustion, are subjected to massive skeletal muscle loss by apoptosis.⁸³

However, depending on the cell type, cell context, and severity of the insult, depletion of mitochondrial SRC does not always result in cell death. Thus, endothelial cells that

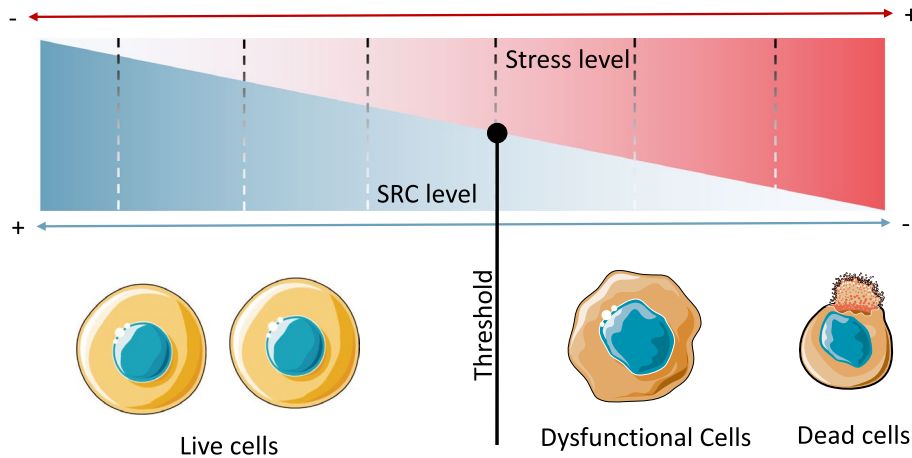


FIGURE 3 Schematic representation of the consequences of SRC reduction in non-transformed cells (see text for details)

exposed to oxidative stress and reduced SRC levels enter a state of cellular senescence associated with impairment of endothelial cell functions.⁴⁹

6 | PARTICULAR CIRCUMSTANCES: RELEVANCE OF SRC DETERMINATION IN CANCER CELLS

6.1 | Low SRC levels: A metabolic trait in most cancer cell types?

Beyond the canonical glycolytic phenotype originally described by Warburg,⁸⁴ cancer cells can use other carbon sources such as glutamine or fatty acid that are oxidized in mitochondria for energy production and/or anabolism. Thus, it is now well established that cancer metabolism is more heterogeneous than expected and, in addition to the classic glycolytic phenotype, cancer cells can display a mitochondrial oxidative phenotype. Besides, cancer cells can shift from one glycolytic phenotype to a mitochondrial phenotype to adapt to external (stress from environmental conditions) or internal (consequences of gene expression) signals. It appears that the metabolic flexibility of cancer cells can predict tumor aggressiveness. In many cancer types, cancer progression, development of metastases, and drug-resistance acquisition require the presence of a mitochondrial oxidative phenotype.⁸⁵

Irrespective of metabolic heterogeneity, most cancer cells are characterized by low SRC levels compared to their normal counterparts. Thus, SRC is substantially reduced in osteogenic sarcoma cells compared to osteocytes.⁸⁶ SRC is consistently depleted in glioblastoma cells whereas it is maintained in the nontumorigenic normal cells.⁸⁷ In comparison to peripheral mononuclear cells, acute myeloid leukemia cells have lower SRC levels (up to a threefold decrease) despite an elevated mitochondrial mass.¹³ Acute myeloid

leukemia (AML) cells presenting IDH mutations correspond to a subset of cells with even lower SRC levels.⁸⁸ One exception is chronic lymphocytic leukemia cells that have higher SRC levels than B cells probably due to the increase in mitochondrial content.⁸⁹ However, one drawback of the above studies is that SRC values were obtained from stable cancer cell lines cultured *in vitro* often in high glucose medium, a metabolic condition that may not adequately represent the *in vivo* situation. These results should be validated in primary cells directly isolated from patients. Low SRC levels were mostly due to an inability to fully increase maximum respiration rather than changes in basal respiration.¹³ The reason why cancer cells exhibit low SRC and maximal respiration values compared to non-transformed cells remains unknown. This could be due to the negative regulation of mitochondrial respiration by the excessive glycolytic intermediates accumulation, a phenomenon called the Crabtree effect⁹⁰ and/or the molecular and genetic mechanisms underlying cancer development (see below).

6.2 | Specific regulation of SRC levels in cancer

Several lines of experimental evidence suggest that low SRC levels are closely related to the malignant transformation. Thus, mitochondrial metabolism and SRC are regulated by oncogenes, tumor suppressors, and transcription factors involved in the multi-step progression of carcinogenesis. Interestingly, the transformation program of immortalized human fibroblast BJ cells by destroying the tumor suppressor p53 and introducing an oncogenic mutant of KRAS is accompanied by a reduction in SRC levels.⁹¹ The immortalization of fibroblast cells also results in decreased SRC levels.⁹¹ Squamous cell carcinoma cells with P53 mutation display decreased SRC levels in comparison to the wild type P53 isogenic counterpart and mainly rely on glycolysis for

survival.⁹² In Ras-mutated glioblastoma, aberrant Ras signaling reduces SRC levels in attenuating PDH activity through PDH phosphatase downregulation.⁸⁷ Activation of the Ras/Erk signaling also induces SDHA inhibition via TRAP1 phosphorylation and thereby leads to SRC suppression.⁹³

The prototypic example of the influence of oncogenes on mitochondrial metabolism and SRC is represented by the mutationally activated BRAF (Figure 4). BRAF mutation, such as the BRAFV600E mutation, is present in 50% of melanomas and also in several solid tumors. The presence of the BRAFV600E mutation leads to the constitutive activation of the MEK/ERK cascade to stimulate cell growth and proliferation. Mutated BRAF also reprograms the melanoma metabolism increasing aerobic glycolysis and repressing mitochondrial oxidation (for review 94,95). Oncogenic BRAF mutant downregulates SRC via several distinct mechanisms. First, BRAF mutants negatively regulate mitochondrial biogenesis *via* the downregulation of the MITF/PGC1 α pathway. Second, BRAF mutated melanoma cells reduce the entry of glucose-derived pyruvate into the TCA cycle by decreasing the activity of the mitochondrial gatekeeper enzyme pyruvate dehydrogenase (PDH). Indeed, BRAF mutants are characterized by a high expression of HIF-1 α and of its downstream target PDK acting as a crucial inhibitor of PDH activity. Finally, it may be possible that low SRC levels of BRAF mutated cancers are also due to the disruption of mitochondrial dynamics. Thus, the constitutive activation of the MAPK pathway upregulates dynamin related-protein 1 (DRP-1)

expression and activity leading to intense mitochondrial fission and eventually to respiration decrease.⁹⁶

Overall, these data indicate that the underlying genetic network largely contributes to low SRC levels in cancer cells.

6.3 | SRC significance in cancer

As compared to normal cells, low SRC levels can be seen as a metabolic weakness of cancer cells reflecting a partial inability to adapt mitochondrial metabolism to stress conditions.¹³ Thus, cancer cells possess metabolically “exhausted” mitochondria that could be therapeutically targeted and could be the potential “Achilles' heel” of cancer cells. Similarly, a negative correlation between SRC levels and sensitivity to the ETC targeted drug, metformin in diverse cancer cell lines was reported, suggesting that SRC-based stratification could predict the efficacy of ETC targeting drugs in cancer clinical trials.⁹¹ In line with this, lower SRC level render acute myeloid leukemia more sensitive to ETC inhibitors and oxidative stressors.¹³ However, given the importance of glycolysis in the metabolism of cancer cells, this fragility is only relative since cancer cells can compensate for ATP production outside the mitochondria through the activation of aerobic glycolysis. Thus, low SRC levels may not always be sufficient to constitute a metabolic weakness, which may only be present if there is also an inability to increase glycolysis.⁹⁷

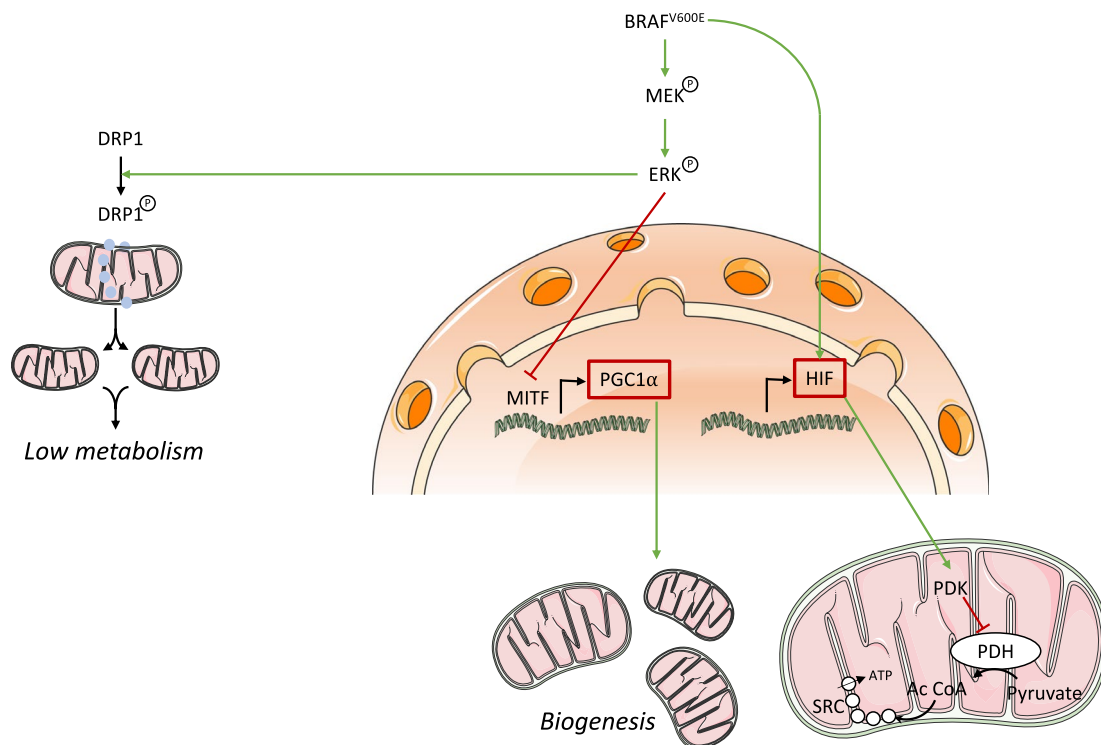


FIGURE 4 Schematic view of the metabolic circuitries that control low SRC levels in BRAF-mutated melanoma (see text for details)

TABLE 2 SRC modifications in cancer resistant to anticancer drugs

Drug resistance	OXPHOS modifications	Cellular Models	Reference
Doxycycline	Upregulation of all OXPHOS parameters (Basal, ATP-linked, Maximal) Upregulation of SRC	Hepatocellular carcinoma cells	116
5-fluorouracil	Upregulation of Basal OCR No modification of SRC	Colon cancer cells	117
5-FU	Upregulation of Maximal OCR Upregulation of SRC	Colon cancer	118
Cisplatin	Upregulation of Maximal OCR Upregulation of SRC	Ovarian cancer	119
Cisplatin	Downregulation of OXPHOS (Basal, Maximal, ATP-linked OCR)	Ovarian cancer	120
Cisplatin	Upregulation of Basal OCR No modification of SRC	Esophageal adenocarcinoma	121
Tamoxifen	Upregulation of all OXPHOS parameters (Basal, ATP-linked, Maximal) No modification of SRC	Breast Cancer	122
Radiation	Downregulation of all OXPHOS parameters (Basal, ATP-linked, Maximal) Downregulation of SRC	Head and neck squamous cell cancer	123
Tyrosine kinase inhibitor	Upregulation of all OXPHOS parameters (Basal, ATP-linked, Maximal) Upregulation of SRC	AML	124
Bcl-2 inhibitor	Upregulation of all OXPHOS parameters (Basal, ATP-linked, Maximal) Upregulation of SRC	Lymphoma	125
Irinotecan	Upregulation of Basal OCR No modification of SRC	NSCLC	126
Vemurafenib	Upregulation of all OXPHOS parameters (Basal, ATP-linked, Maximal) Upregulation of SRC variable	Melanoma	103
Flavopiridol	Upregulation of Basal and Maximal OCR No modification of SRC	Prostate cancer DU145cells	127
Erlotinib	Downregulation of all OXPHOS parameters (Basal, ATP-linked, Maximal) Downregulation of SRC	NSCLC	128
Multidrug resistance phenotype	Downregulation of all OXPHOS parameters (Basal, ATP-linked, Maximal) Downregulation of SRC	Carcinoma lung cancer NCI-H460	129
Temozolomide	Upregulation of SRC	Glioma Cells	100

Apart from that, during neoplastic progression, cancer cells display a progressive increase in SRC levels reflecting a more oxidative metabolism potentially required to respond to the increasing energy demand. Tumor invasion is associated with increased SRC in ovarian cancer due to the enhancement of pyruvate metabolism.⁹⁸ The increasing SRC in cancer can be also seen as a mechanistic step in the acquisition of drug

resistance rendering cell survival possible via a metabolic shift toward efficient mitochondrial metabolism.⁹⁹

The response of cancer cells to anticancer drugs often results in SRC variations. A number of chemotherapy drugs exert stress on the cancer cell that is responsible for their anticancer activity. Depending on the class of the drug, the nature of stress varies including oxidative and genotoxic stress.

Both of these stresses could potentially reduce the SRC levels and thereby explain why anticancer drugs decrease SRC levels in sensitive cells (see Table 1) and why this reduction is correlated with their anticancer effects.⁹¹ Consequences of cancer drugs on SRC are mainly caused by their decreased effects on the maximal respiration rate (Table 1).

Conversely, chemotherapy resistance has been associated with increased SRC that could occasionally be associated with changes in the mitochondrial respiratory chain expression, predominantly at cytochrome c oxidase level.¹⁰⁰ Here, we summarize the data available on SRC in cancer drug resistance (Table 2). Increased SRC was correlated with drug resistance to DNA-damaging agents such as hexavalent chromium Cr(VI) or cisplatin.⁹⁹ Moreover, high SRC levels often characterize cancer cells resistant to targeted agents. As compared to the parental cell line, higher SRC levels were observed in venetoclax-resistant AML cells.¹⁰¹ Waldenstrom macroglobulinemia cells resistant to the Bruton tyrosine kinase inhibitor, Ibrutinib, have also higher SRC levels than their sensitive counterparts.¹⁰² Likewise, in several models of resistance to BRAF/MEK inhibitors, melanoma cells were associated with a high SRC, an observation compatible with their high oxidative activity.¹⁰³ Interestingly, in most studies baseline respiration was inconsistent to detect drug resistance and SRC and/or maximal respiration rate constitutes one of the best parameters correlated with drug resistance.

7 | CONCLUSION

Overall, the physiological role of SRC is to help non-transformed cells adapt to an abrupt increase in bioenergetic demands and therefore promote short-term stress survival. In this context, SRC can be used as a predictive marker of how well the cell might deal with acute cellular stress. Herein, studies highlight the relevance of measuring SRC for assessing or predicting cell response to stress. Interestingly, it should be noted that SRC levels were previously measured on platelets from patients with pulmonary hypertension. In these conditions, it was shown to be a valuable predictive marker correlating with disease progression and severity.²³ Nevertheless, the SRC value should be interpreted with caution since its physiological meaning critically depends on the cellular context. It turns out that SRC values vary greatly according to cell types and low SRC levels do not always mean mitochondrial dysfunction. It would seem that mitochondria with high SRC levels are mitochondria with energetic roles whereas mitochondria with low SRC levels are involved in anabolic functions as is the case with cancer cells.

Understanding the molecular circuits responsible for SRC is particularly important if one wishes to manipulate SRC levels for therapeutic purposes. Thus, it could be useful to

reinforce SRC to avoid cardiac decompensation in ventricular hypertrophy. Conversely, reducing SRC levels of resistant cancer cells could make them more sensitive to mitochondrial-targeting drugs.

Finally, we suggest to use SRC as a key parameter (i) to determine the metabolic bioenergetic profile; (ii) to predict the resistance of non-transformed cells to stress and (iii) to predict the aggressiveness of cancer cells including the acquisition of drug resistance.

ACKNOWLEDGMENTS

This work received financial support from INSERM, UNIVERSITE DE LILLE, Ligue contre le Cancer (to PM and JK). QF and RK are recipients of CHRU Lille-Université Nord-Pas de Calais fellowships. NG declare no financial or commercial conflict of interest.

CONFLICT OF INTEREST

NG declare no financial or commercial conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Q. Fovez designed the figures; P. Marchetti, N. Germain, R. Khamari, Q. Fovez, J. Kluza wrote and edited the manuscript. No authors declared any potential conflicts of interest.

REFERENCES

- Hill BG, Benavides GA, Lancaster JR, et al. Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. *Biol Chem*. 2012;393:1485-1512.
- Nicholls DG. Spare respiratory capacity, oxidative stress and excitotoxicity. *Biochim Soc Trans*. 2009;37:1385-1388.
- Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J*. 2011;435:297-312.
- Germain N, Dessein A-F, Vienne J-C, et al. First-line screening of OXPHOS deficiencies using microscale oxygraphy in human skin fibroblasts: a preliminary study. *Int J Med Sci*. 2019;16:931-938.
- James AD, Patel W, Butt Z, et al. The plasma membrane calcium pump in pancreatic cancer cells exhibiting the Warburg effect relies on glycolytic ATP. *J Biol Chem*. 2015;290:24760-24771.
- Carbognin E, Betto RM, Soriano ME, Smith AG, Martello G. Stat3 promotes mitochondrial transcription and oxidative respiration during maintenance and induction of naive pluripotency. *EMBO J*. 2016;35:618-634.
- Kunz WS. Different metabolic properties of mitochondrial oxidative phosphorylation in different cell types—important implications for mitochondrial cytopathies. *Exp Physiol*. 2003;88:149-154.
- Nguyen HM, Mejia EM, Chang W, et al. Reduction in cardiolipin decreases mitochondrial spare respiratory capacity and increases glucose transport into and across human brain cerebral microvascular endothelial cells. *J Neurochem*. 2016;139:68-80.
- Johnson-Cadwell LI, Jekabsons MB, Wang A, Polster BM, Nicholls DG. “Mild Uncoupling” does not decrease mitochondrial superoxide levels in cultured cerebellar granule neurons but decreases spare respiratory capacity and increases toxicity to glutamate and oxidative stress. *J Neurochem*. 2007;101:1619-1631.

10. Pflieger J, He M, Abdellatif M. Mitochondrial complex II is a source of the reserve respiratory capacity that is regulated by metabolic sensors and promotes cell survival. *Cell Death Dis.* 2015;6:e1835.
11. Sciacovelli M, Guzzo G, Morello V, et al. The mitochondrial chaperone TRAP1 promotes neoplastic growth by inhibiting succinate dehydrogenase. *Cell Metab.* 2013;17:988-999.
12. Ehinger JK, Piel S, Ford R, et al. Cell-permeable succinate prodrugs bypass mitochondrial complex I deficiency. *Nat Commun.* 2016;7:12317.
13. Sriskanthadevan S, Jeyaraju DV, Chung TE, et al. AML cells have low spare reserve capacity in their respiratory chain that renders them susceptible to oxidative metabolic stress. *Blood.* 2015;125:2120-2130.
14. Chen J, Henderson GI, Freeman GL. Role of 4-hydroxynonenal in modification of cytochrome c oxidase in ischemia/reperfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33:1919-1927.
15. De Waal D, Nogueira V, and Terry AR, et al. Hexokinase-2 depletion inhibits glycolysis and induces oxidative phosphorylation in hepatocellular carcinoma and sensitizes to metformin. *Nature Communications.* 2018;9(1).
16. Li X, Han G, Li X, et al. Mitochondrial pyruvate carrier function determines cell stemness and metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncotarget.* 2017;8(28):46363-46380.
17. Bader DA, Hartig SM, Putluri V, et al. Mitochondrial pyruvate import is a metabolic vulnerability in androgen receptor-driven prostate cancer. *Nat Metab.* 2019;1(1):70-85.
18. Lam WY, Becker AM, Kennerly KM, et al. Mitochondrial pyruvate import promotes long-term survival of antibody-secreting plasma cells. *Immunity.* 2016;45:60-73.
19. Ždralević M, Vučetić M, Daher B, Marchiq I, Parks SK, Pouysségur J. Disrupting the 'Warburg effect' re-routes cancer cells to OXPHOS offering a vulnerability point via "ferroptosis"-induced cell death. *Adv Biol Regul.* 2018;68:55-63.
20. Esteves P, Pecqueur C, Ransy C, et al. Mitochondrial retrograde signaling mediated by UCP2 inhibits cancer cell proliferation and tumorigenesis. *Cancer Res.* 2014;74:3971-3982.
21. Diers AR, Broniowska KA, Chang C-F, Hogg N. Pyruvate fuels mitochondrial respiration and proliferation of breast cancer cells: effect of monocarboxylate transporter inhibition. *Biochem J.* 2012;444:561-571.
22. Sansbury BE, Jones SP, Riggs DW, Darley-USmar VM, Hill BG. Bioenergetic function in cardiovascular cells: the importance of the reserve capacity and its biological regulation. *Chem Biol Interact.* 2011;191:288-295.
23. Nguyen QL, Corey C, White P, et al. Platelets from pulmonary hypertension patients show increased mitochondrial reserve capacity. *JCI Insight.* 2018;2:1-10.
24. Sukumar M, Liu J, Mehta GU, et al. Mitochondrial membrane potential identifies cells with enhanced stemness for cellular therapy. *Cell Metab.* 2016;23:63-76.
25. Patsoukis N, Bardhan K, Chatterjee P, et al. PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat Commun.* 2015;6:6692.
26. Malinarich F, Duan K, Hamid RA, et al. High mitochondrial respiration and glycolytic capacity represent a metabolic phenotype of human tolerogenic dendritic cells. *J Immunol.* 2015;194:5174-5186.
27. Yamamoto H, Morino K, Mengistu L, et al. Amla enhances mitochondrial spare respiratory capacity by increasing mitochondrial biogenesis and antioxidant systems in a murine skeletal muscle cell line. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1-11.
28. Kashatus JA, Nascimento A, Myers LJ, et al. Erk2 phosphorylation of Drp1 promotes mitochondrial fission and MAPK-driven tumor growth. *Mol Cell.* 2015;57:537-551.
29. Vazquez F, Lim J-H, Chim H, et al. PGC1 α expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress. *Cancer Cell.* 2013;23:287-301.
30. Xie D, Wu X, Lan L, et al. Downregulation of TFAM inhibits the tumorigenesis of non-small cell lung cancer by activating ROS-mediated JNK/p38MAPK signaling and reducing cellular bioenergetics. *Oncotarget.* 2016;7:11609-11624.
31. Costa AC, Loh SHY, Martins LM. Drosophila Trap1 protects against mitochondrial dysfunction in a PINK1/parkin model of Parkinson's disease. *Cell Death Dis.* 2019;4(1):1-10.
32. Stevens DA, Lee Y, Kang HC, et al. Parkin loss leads to PARIS-dependent declines in mitochondrial mass and respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:11696-11701.
33. Dhingra R, Margulets V, Chowdhury SR, et al. Bnip3 mediates doxorubicin-induced cardiac myocyte necrosis and mortality through changes in mitochondrial signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:E5537-E5544.
34. Bayot A, Basse N, Lee I, et al. Towards the control of intracellular protein turnover: mitochondrial Lon protease inhibitors versus proteasome inhibitors. *Biochimie.* 2008;90:260-269.
35. Strauss KA, Jinks RN, Puffenberger EG, et al. CODAS syndrome is associated with mutations of LONP1, encoding mitochondrial AAA. *Am J Hum Genet.* 2015;96:121-135.
36. Finley LWS, Haas W, Desquiere-Dumas V, et al. Succinate dehydrogenase is a direct target of sirtuin 3 deacetylase activity. *PLoS One.* 2011;6:e23295.
37. Vincent EE, Coelho PP, Blagih J, Griss T, Viollet B, Jones RG. Differential effects of AMPK agonists on cell growth and metabolism. *Oncogene.* 2015;34:3627-3639.
38. Marin TL, Gongol B, Zhang F, et al. AMPK promotes mitochondrial biogenesis and function by phosphorylating the epigenetic factors DNMT1, RBBP7, and HAT1. *Sci Signal.* 2017;10:eaa7478.
39. Czajka A, Malik AN. Hyperglycemia induced damage to mitochondrial respiration in renal mesangial and tubular cells: implications for diabetic nephropathy. *Redox Biol.* 2016;10:100-107.
40. Roy Chowdhury SK, Smith DR, Saleh A, et al. Impaired adenosine monophosphate-activated protein kinase signalling in dorsal root ganglia neurons is linked to mitochondrial dysfunction and peripheral neuropathy in diabetes. *Brain.* 2012;135:1751-1766.
41. Armstrong JA, Cash NJ, Ouyang Y, et al. Oxidative stress alters mitochondrial bioenergetics and modifies pancreatic cell death independently of cyclophilin D, resulting in an apoptosis-to-necrosis shift. *J Biol Chem.* 2018;293:8032-8047.
42. Dranka BP, Benavides GA, Diers AR, et al. Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling. *Free Radic Biol Med.* 2011;51:1621-1635.
43. Dranka BP, Hill BG, Darley-USmar VM. Mitochondrial reserve capacity in endothelial cells: the impact of nitric oxide and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2010;48:905-914.

44. Hill BG, Higdon AN, Dranka BP, Darley-USmar VM. Regulation of vascular smooth muscle cell bioenergetic function by protein glutathiolation. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1797:285-295.
45. Bernard K, Logsdon NJ, Miguel V, et al. NADPH Oxidase 4 (Nox4) suppresses mitochondrial biogenesis and bioenergetics in lung fibroblasts via a nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (Nrf2)-dependent pathway. *J Biol Chem*. 2017;292:3029-3038.
46. Hemachandra LPMP, Shin D-H, Dier U, et al. Mitochondrial superoxide dismutase has a protumorigenic role in ovarian clear cell carcinoma. *Cancer Res*. 2015;75:4973-4984.
47. Holley AK, Dhar SK, St Clair DK. Curbing cancer's sweet tooth: is there a role for MnSOD in regulation of the Warburg effect? *Mitochondrion*. 2013;13:170-188.
48. Hill BG, Dranka BP, Zou L, Chatham JC, Darley-USmar VM. Importance of the bioenergetic reserve capacity in response to cardiomyocyte stress induced by 4-hydroxynonenal. *Biochem J*. 2009;424:99-107.
49. Nannelli G, Terzuoli E, Giorgio V, et al. ALDH2 activity reduces mitochondrial oxygen reserve capacity in endothelial cells and induces senescence properties. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:9765027.
50. Li C, Zhang G, Zhao L, Ma Z, Chen H. Metabolic reprogramming in cancer cells: glycolysis, glutaminolysis, and Bcl-2 proteins as novel therapeutic targets for cancer. *World J Surg Oncol*. 2016;14:15.
51. Perez J, Hill BG, Benavides GA, Dranka BP, Darley-USmar VM. Role of cellular bioenergetics in smooth muscle cell proliferation induced by platelet-derived growth factor. *Biochem J*. 2010;428:255-267.
52. Maryanovich M, Zaltsman Y, Ruggiero A, et al. An MTCH2 pathway repressing mitochondria metabolism regulates haematopoietic stem cell fate. *Nat Commun*. 2015;6:7901.
53. Li C, Li Y, He L, et al. Free radical biology and medicine. *Free Radic Biol Med*. 2013;60:29-40.
54. Agostini M, Romeo F, Inoue S, et al. Metabolic reprogramming during neuronal differentiation. *Cell Death Differ*. 2016;23:1502-1514.
55. Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vazquez F, Mootha VK, Puigserver P. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 α transcriptional complex. *Nature*. 2007;450:736-740.
56. Goo CK, Lim HY, Ho QS, Too H-P, Clement M-V, Wong KP. PTEN/Akt signaling controls mitochondrial respiratory capacity through 4E-BP1. *PLoS One*. 2012;7:e45806.
57. Li T, Han J, Jia L, Hu X, Chen L, Wang Y. PKM2 coordinates glycolysis with mitochondrial fusion and oxidative phosphorylation. *Protein Cell*. 2019;10:583-594.
58. Demaria M, Camporeale A, Poli V. STAT3 and metabolism: how many ways to use a single molecule? *Int J Cancer*. 2014;135:1997-2003.
59. Meier JA, Larner AC. Toward a new STAtE: the role of STATs in mitochondrial function. *Semin Immunol*. 2014;26:20-28.
60. Rincon M, Pereira F. A new perspective: mitochondrial Stat3 as a regulator for lymphocyte function. *IJMS*. 2018;19:1656.
61. Kramer PA, Ravi S, Chacko B, Johnson MS, Darley-USmar VM. A review of the mitochondrial and glycolytic metabolism in human platelets and leukocytes: implications for their use as bioenergetic biomarkers. *Redox Biol*. 2014;2:206-210.
62. Feng LR, Maguire-Zeiss KA. Gene therapy in Parkinson's disease: rationale and current status. *CNS Drugs*. 2010;24:177-192.
63. Divakaruni AS, Paradise A, Ferrick DA, Murphy AN, Jastroch M. Analysis and interpretation of microplate-based oxygen consumption and pH data. *Meth Enzymol*. 2014;547:309-354.
64. Fern R. Variations in spare electron transport chain capacity: the answer to an old riddle? *J Neurosci Res*. 2003;71:759-762.
65. Varum S, Rodrigues AS, Moura MB, et al. Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts. *PLoS One*. 2011;6:e20914.
66. Keuper M, Jastroch M, Yi C-X, et al. Spare mitochondrial respiratory capacity permits human adipocytes to maintain ATP homeostasis under hypoglycemic conditions. *FASEB J*. 2014;28:761-770.
67. Fortini P, Ferretti C, Iorio E, et al. The fine tuning of metabolism, autophagy and differentiation during in vitro myogenesis. *Cell Death Dis*. 2016;7:e2168-e2212.
68. Forni MF, Peloggia J, Trudeau K, Shirihai O, Kowaltowski AJ. Murine mesenchymal stem cell commitment to differentiation is regulated by mitochondrial dynamics. *Stem Cells*. 2015;34:743-755.
69. Greco M, Villani G, Mazzucchelli F, Bresolin N, Papa S, Attardi G. Marked aging-related decline in efficiency of oxidative phosphorylation in human skin fibroblasts. *FASEB J*. 2003;17:1706-1708.
70. Kim H, Ham S, Jo M, et al. CRISPR-Cas9 mediated telomere removal leads to mitochondrial stress and protein aggregation. *IJMS*. 2017;18:2093.
71. Desler C, Hansen TL, Frederiksen JB, Marcker ML, Singh KK, Juel Rasmussen L. Is there a link between mitochondrial reserve respiratory capacity and aging? *J Aging Res*. 2012;2012:1-9.
72. Pearce EL, Poffenberger MC, Chang C-H, Jones RG. Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science*. 2013;342:1242-1245.
73. Gerriets VA, Kishton RJ, Nichols AG, et al. Metabolic programming and PDHK1 control CD4+ T cell subsets and inflammation. *J Clin Invest*. 2015;125:194-207.
74. van der Windt GJW, Everts B, Chang C-H, et al. Mitochondrial respiratory capacity is a critical regulator of CD8+ T cell memory development. *Immunity*. 2012;36:68-78.
75. Raud B, Roy DG, Divakaruni AS, et al. Etomoxir actions on regulatory and memory T cells are independent of Cpt1 α -mediated fatty acid oxidation. *Cell Metab*. 2018;28:504-515.e7.
76. Buck MD, O'Sullivan D, Klein Geltink RI, et al. Mitochondrial dynamics controls T cell fate through metabolic programming. *Cell*. 2016;166:63-76.
77. Everts B, Amiel E, Huang SC-C, et al. TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKKe supports the anabolic demands of dendritic cell activation. *Nat Immunol*. 2014;15:323-332.
78. van der Windt GJW, O'Sullivan D, Everts B, et al. CD8 memory T cells have a bioenergetic advantage that underlies their rapid recall ability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:14336-14341.
79. Yao J, Irwin RW, Zhao L, Nilsen J, Hamilton RT, Brinton RD. Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:14670-14675.
80. Yadava N, Nicholls DG. Spare respiratory capacity rather than oxidative stress regulates glutamate excitotoxicity after partial respiratory inhibition of mitochondrial complex I with rotenone. *J Neurosci*. 2007;27:7310-7317.

81. Guzmán Montesana G, Báez AL, Lo Presti MS, et al. Functional and structural alterations of cardiac and skeletal muscle mitochondria in heart failure patients. *Arch Med Res.* 2014;45:237-246.
82. Gong G, Liu J, Liang P, et al. Oxidative capacity in failing hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:H541-H548.
83. Hiona A, Sanz A, Kujoth GC, et al. Mitochondrial DNA mutations induce mitochondrial dysfunction, apoptosis and sarcopenia in skeletal muscle of mitochondrial DNA mutator mice. *PLoS One.* 2010;5:e11468.
84. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956;123:309-314.
85. Valcarcel-Jimenez L, Gaude E, Torrano V, Frezza C, Carracedo A. Mitochondrial metabolism: Yin and Yang for tumor progression. *Trends Endocrinol. Metab.* 2017;28:748-757.
86. Anso E, Mullen AR, Felsner DW, Matés JM, DeBerardinis RJ, Chandel NS. Metabolic changes in cancer cells upon suppression of MYC. *Cancer Metab.* 2013;1:7.
87. Prabhu A, Sarcar B, Miller CR, et al. Ras-mediated modulation of pyruvate dehydrogenase activity regulates mitochondrial reserve capacity and contributes to glioblastoma tumorigenesis. *Neuro-Oncology.* 2015;17(9):1220-1230.
88. Oizel K, Gratas C, Nadaradjane A, Oliver L, Vallette FM, Pecqueur C. D-2-Hydroxyglutarate does not mimic all the IDH mutation effects, in particular the reduced etoposide-triggered apoptosis mediated by an alteration in mitochondrial NADH. *Cell Death Dis.* 2015;6:e1704.
89. Jitschin R, Hofmann AD, Bruns H, et al. Mitochondrial metabolism contributes to oxidative stress and reveals therapeutic targets in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2014;123(17):2663-2672.
90. Díaz-Ruiz R, Rigoulet M, Devin A. The Warburg and Crabtree effects: on the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1807:568-576.
91. Teh JT, Zhu WL, Newgard CB, Casey PJ, Wang M. Respiratory capacity and reserve predict cell sensitivity to mitochondria inhibitors: mechanism-based markers to identify metformin-responsive cancers. *Mol Cancer Ther.* 2019;18:693-705.
92. Sandulache VC, Skinner HD, Ow TJ, et al. Individualizing antimetabolic treatment strategies for head and neck squamous cell carcinoma based on TP53 mutational status. *Cancer.* 2011;118:711-721.
93. Masgras I, Sanchez-Martin C, Colombo G, Rasola A. The chaperone TRAP1 as a modulator of the mitochondrial adaptations in cancer cells. *Front Oncol.* 2017;7:555.
94. Marchetti P, Trinh A, Khamari R, Kluza J. Melanoma metabolism contributes to the cellular responses to MAPK/ERK pathway inhibitors. *Biochim Biophys Acta.* 2018;1862:999-1005.
95. Marchetti P, Guerreschi P, Kluza J, Mortier L. Metabolic features of melanoma: a gold mine of new therapeutic targets? *Curr Cancer Drug Targets.* 2014;14:357-370.
96. Serasinghe MN, Wieder SY, Renault TT, et al. Mitochondrial division is requisite to RAS-induced transformation and targeted by oncogenic MAPK pathway inhibitors. *Mol Cell.* 2015;57:521-536.
97. Lagadinou ED, Sach A, Callahan K, et al. BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells. *Stem Cell.* 2013;12(3):1-13.
98. Caneba CA, Bellance N, Yang L, Pabst L, Nagrath D. Pyruvate uptake is increased in highly invasive ovarian cancer cells under anoikis conditions for anaplerosis, mitochondrial function, and migration. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012;303:E1036-E1052.
99. Nickens KP, Wikstrom JD, Shirihai OS, Patierno SR, Ceryak S. A bioenergetic profile of non-transformed fibroblasts uncovers a link between death-resistance and enhanced spare respiratory capacity. *Mitochondrion.* 2013;13:662-667.
100. Oliva CR, Nozell SE, Diers A, et al. Acquisition of temozolomide chemoresistance in gliomas leads to remodeling of mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem.* 2010;285:39759-39767.
101. Zhang QI, Han L, Shi CE, et al. Upregulation of MAPK/MCL-1 maintaining mitochondrial oxidative phosphorylation confers acquired resistance to BCL-2 inhibitor venetoclax in AML. *Blood.* 2016;128:101.
102. Paulus A, Akhtar S, Yousaf H, et al. Waldenstrom macroglobulinemia cells devoid of BTK(C481S) or CXCR4(WHIM-like) mutations acquire resistance to ibrutinib through upregulation of Bcl-2 and AKT resulting in vulnerability towards venetoclax or MK2206 treatment. *Blood Cancer J.* 2017;7:e565.
103. Corazao Rozas P, Guerreschi P, Jendoubi M, et al. Mitochondrial oxidative stress is the Achilles's heel of melanoma cells resistant to Braf-mutant inhibitor. *Oncotarget.* 2013;4:1986-1998.
104. Karunanithi S, Liu R, Roe A, et al. Abstract 382: inhibition of mitochondrial spare respiratory capacity by new securinine derivatives as a novel differentiation therapy for acute myeloid leukemia. *Cancer Res.* 2018;78:382.
105. Pollyea DA, Stevens BM, Jones CL, et al. Venetoclax with azacitidine disrupts energy metabolism and targets leukemia stem cells in patients with acute myeloid leukemia. *Nat Med.* 2018;24(12):1-13.
106. Jones CL, Stevens BM, D'Alessandro A, et al. Inhibition of amino acid metabolism selectively targets human leukemia stem cells. *Cancer Cell.* 2018;34:724-740.e4.
107. Zhang G, Frederick DT, Wu L, et al. Targeting mitochondrial biogenesis to overcome drug resistance to MAPK inhibitors. *J Clin Invest.* 2016;126:1834-1856.
108. Corazao Rozas P, Guerreschi P, André F, et al. Mitochondrial oxidative phosphorylation controls cancer cell's life and death decisions upon exposure to MAPK inhibitors. *Oncotarget.* 2016;7:39473-39485.
109. Le Grand M, Berges R, Pasquier E, et al. Akt targeting as a strategy to boost chemotherapy efficacy in non-small cell lung cancer through metabolism suppression. *Sci Rep.* 2017;7:45136.
110. Takahashi H, Inoue J, Sakaguchi K, Takagi M, Mizutani S, Inazawa J. Autophagy is required for cell survival under L-asparaginase-induced metabolic stress in acute lymphoblastic leukemia cells. *Oncogene.* 2017;120:4267-4276.
111. Mouradian M, Kikawa KD, Dranka BP, Komar SM, Kalyanaraman B, Pardini RS. Docosahexaenoic acid attenuates breast cancer cell metabolism and the Warburg phenotype by targeting bioenergetic function. *Mol Carcinog.* 2015;54:810-820.
112. Shen H, Hau E, Joshi S, Dilda PJ, McDonald KL. Sensitization of glioblastoma cells to irradiation by modulating the glucose metabolism. *Mol Cancer Ther.* 2015;14:1794-1804.
113. Chowdhury PS, Chamoto K, Kumar A, Honjo T. PPAR-induced fatty acid oxidation in T cells increases the number of tumor-reactive CD8+ T cells and facilitates anti-PD-1 therapy. *Cancer Immunol Res.* 2018;6:1375-1387.
114. Trotta AP, Gelles JD, Serasinghe MN, Loi P, Arbiser JL, Chipuk JE. Disruption of mitochondrial electron transport chain function potentiates the pro-apoptotic effects of MAPK inhibition. *J Biol Chem.* 2017;292:11727-11739.

115. Divakaruni AS, Hsieh WY, Minarieta L, et al. Etomoxir inhibits macrophage polarization by disrupting CoA homeostasis. *Cell Metab.* 2018;28:490-503.e7.
116. Wu L, Zhao J, Cao K, et al. Oxidative phosphorylation activation is an important characteristic of DOX resistance in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Commun Signal.* 2018;16:6.
117. Denise C, Paoli P, Calvani M, et al. 5-fluorouracil resistant colon cancer cells are addicted to OXPHOS to survive and enhance stem-like traits. *Oncotarget.* 2015;6:41706-41721.
118. Untereiner AA, Pavlidou A, Druzhyina N, Papapetropoulos A, Hellmich MR, Szabo C. Drug resistance induces the upregulation of H2S-producing enzymes in HCT116 colon cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 2018;149:174-185.
119. Matassa DS, Amoroso MR, Lu H, et al. Oxidative metabolism drives inflammation-induced platinum resistance in human ovarian cancer. *Cell Death Differ.* 2016;23:1542-1554.
120. Amoroso MR, Matassa DS, Agliarulo I, et al. Stress-adaptive response in ovarian cancer drug resistance: role of TRAP1 in oxidative metabolism-driven inflammation. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2017;108:163-198.
121. Buckley AM, Bibby BA, Dunne MR, et al. Characterisation of an isogenic model of cisplatin resistance in oesophageal adenocarcinoma cells. *Pharmaceuticals (Basel).* 2019;12:33.
122. Fiorillo M, Sotgia F, Sisci D, Cappello AR, Lisanti MP. Mitochondrial "power" drives tamoxifen resistance: NQO1 and GCLC are new therapeutic targets in breast cancer. *Oncotarget.* 2017;8:20309-20327.
123. Mims J, Bansal N, Bharadwaj MS, et al. Energy metabolism in a matched model of radiation resistance for head and neck squamous cell cancer. *Radiat Res.* 2015;183:291-304.
124. Huang A, Ju H-Q, Liu K, et al. Metabolic alterations and drug sensitivity of tyrosine kinase inhibitor resistant leukemia cells with a FLT3/ITD mutation. *Cancer Lett.* 2016;377:149-157.
125. Guièze R, Liu VM, Rosebrock D, et al. Mitochondrial reprogramming underlies resistance to BCL-2 inhibition in lymphoid malignancies. *Cancer Cell.* 2019;36(4):369-384.e13.
126. Lee S, Lee J-S, Seo J, et al. Targeting mitochondrial oxidative phosphorylation abrogated irinotecan resistance in NSCLC. *Sci Rep.* 2018;8:15707.
127. Li X, Lu J, Kan Q, et al. Metabolic reprogramming is associated with flavopiridol resistance in prostate cancer DU145 cells. *Sci Rep.* 2017;7:5081.
128. Chiang C-T, Demetriou AN, Ung N, et al. mTORC2 contributes to the metabolic reprogramming in EGFR tyrosine-kinase inhibitor resistant cells in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 2018;434:152-159.
129. Lopes-Rodrigues V, Di Luca A, Mleczko J, et al. Identification of the metabolic alterations associated with the multidrug resistant phenotype in cancer and their intercellular transfer mediated by extracellular vesicles. *Sci Rep.* 2017;7:44541.

How to cite this article: Marchetti P, Fovez Q, Germain N, Khamari R, Kluza J. Mitochondrial spare respiratory capacity: Mechanisms, regulation, and significance in non-transformed and cancer cells. *The FASEB Journal.* 2020;00:1–19. <https://doi.org/10.1096/fj.202000767R>

Annexe 2 : Résultats de métabolomique avec l'[U13C]-Glutamine

Etude des voies métaboliques mitochondriales empruntées par la glutamine en condition basale

En utilisant la même démarche méthodologique que pour notre analyse avec l'[U13C]-Glucose, nous avons également analysé les voies métaboliques empruntées par l'[U13C]-Glutamine lors du fonctionnement basal de la chaîne respiratoire. Nos résultats montrent qu'en condition basale, un marquage en m+5 de l' α -cétoglutarate et en m+4 du succinate, du fumarate et du malate sont retrouvés à partir de l'[U13C]-Glutamine (Figure 33). Ces résultats indiquent donc que lors du fonctionnement basal de la chaîne respiratoire, la glutamine participe à l'anaplérose du cycle de Krebs.

Etude du flux mitochondrial de glutamine en réponse au FCCP.

Lors de la stimulation de la chaîne respiratoire par le FCCP, l'analyse du flux métabolique de l'[U13C]-Glutamine montre une diminution du marquage en m+5 de l' α -cétoglutarate (passe de 40,90% à 28,55%) et en m+4 du succinate (passe de 3,44% à 1,98%), du fumarate (passe de 33,76% à 27,36%) et du malate (passe de 35,21% à 25,47%) (Figure 33). Ainsi lors l'accélération de la chaîne respiratoire induite par le FCCP, ces résultats démontrent qu'il y a une diminution de l'entrée de la glutamine dans le cycle de Krebs.

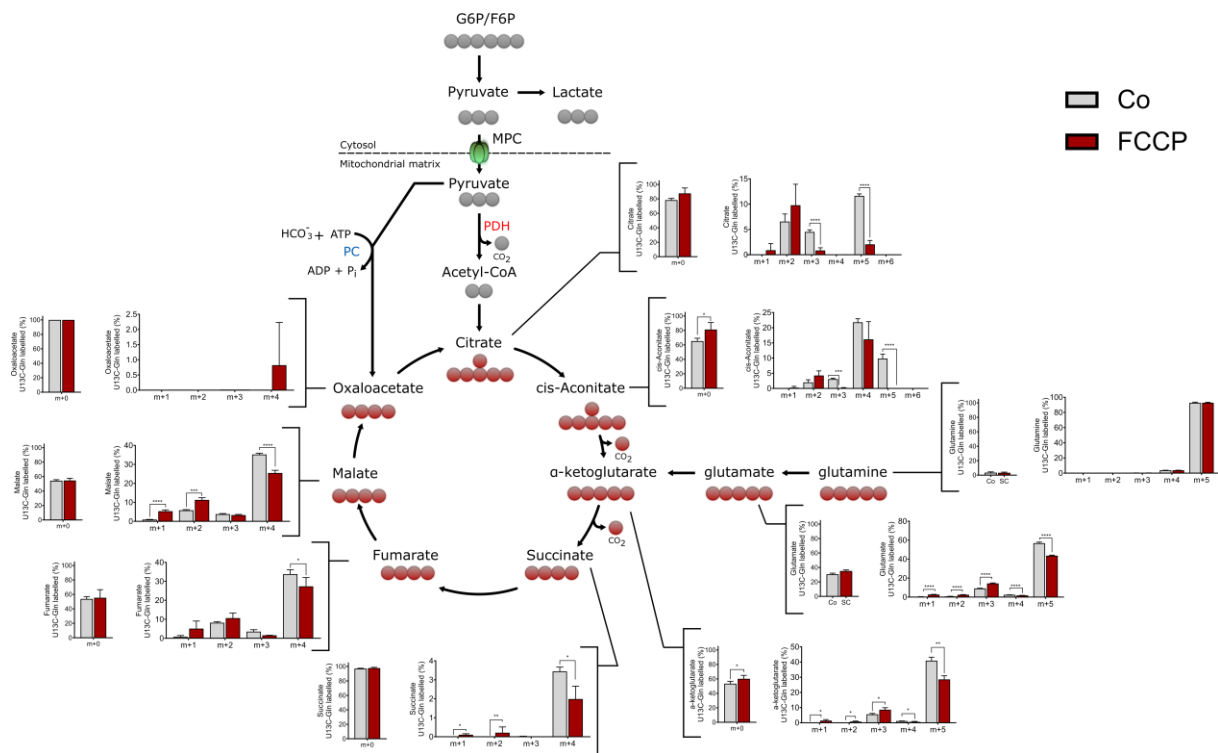


Figure 33. Représentation du flux métabolique emprunté par l'[U13C]-Glutamine dans une condition basale (Co) ou dans une condition où l'activité de la chaîne respiratoire est accélérée en présence de FCCP. Les m+ correspondent au nombre de carbones marqués. (moyenne +/- SD; n > 3; *p < 0,05; **p < 0,01; *p < 0,001; ****p < 0,0001).**

Annexe 3 : Relation entre les composantes de la consommation d'oxygène, de l'activité glycolytique, de l'âge et du pourcentage des blastes et la survie des patients.

Parameter	Pr > Chi ²	Hazard Ratio	95% Hazard Ratio Confidence Limits	
Age	0,0002	1,07	1,033	1,108
OCR Basal	0,2982	0,996	0,989	1,003
ATP turnover	0,3433	0,995	0,985	1,005
Proton leak	0,6084	0,986	0,933	1,041
OCR Max	0,0657	0,997	0,993	1
OCR Non-mt	0,3103	0,986	0,959	1,014
SRC	0,0398	0,994	0,988	1
ECAR Maximal	0,4446	0,991	0,968	1,014
ECAR Basal	0,6295	0,994	0,968	1,02

Tableau 12. Identification des facteurs liés à la survie (patients LAM n=58).

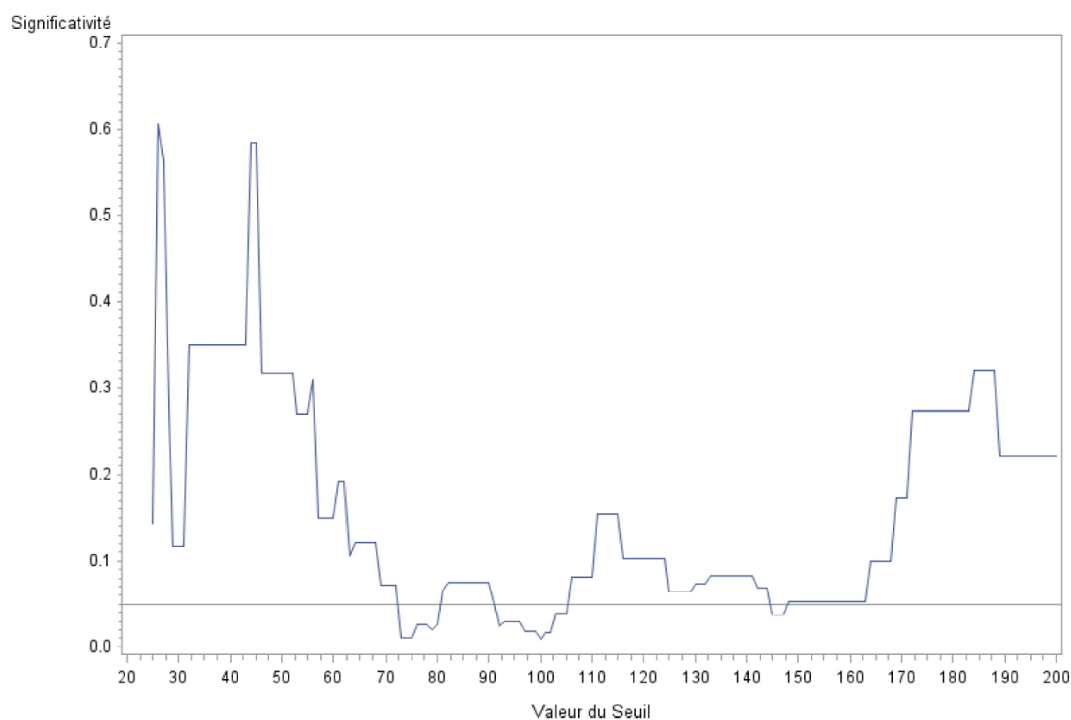


Figure 34. Significativité de l'association entre la SRC et la survie des patients atteints de LAM. La significativité est exprimée en fonction de la valeur de chaque seuil utilisé (patients LAM n=58).

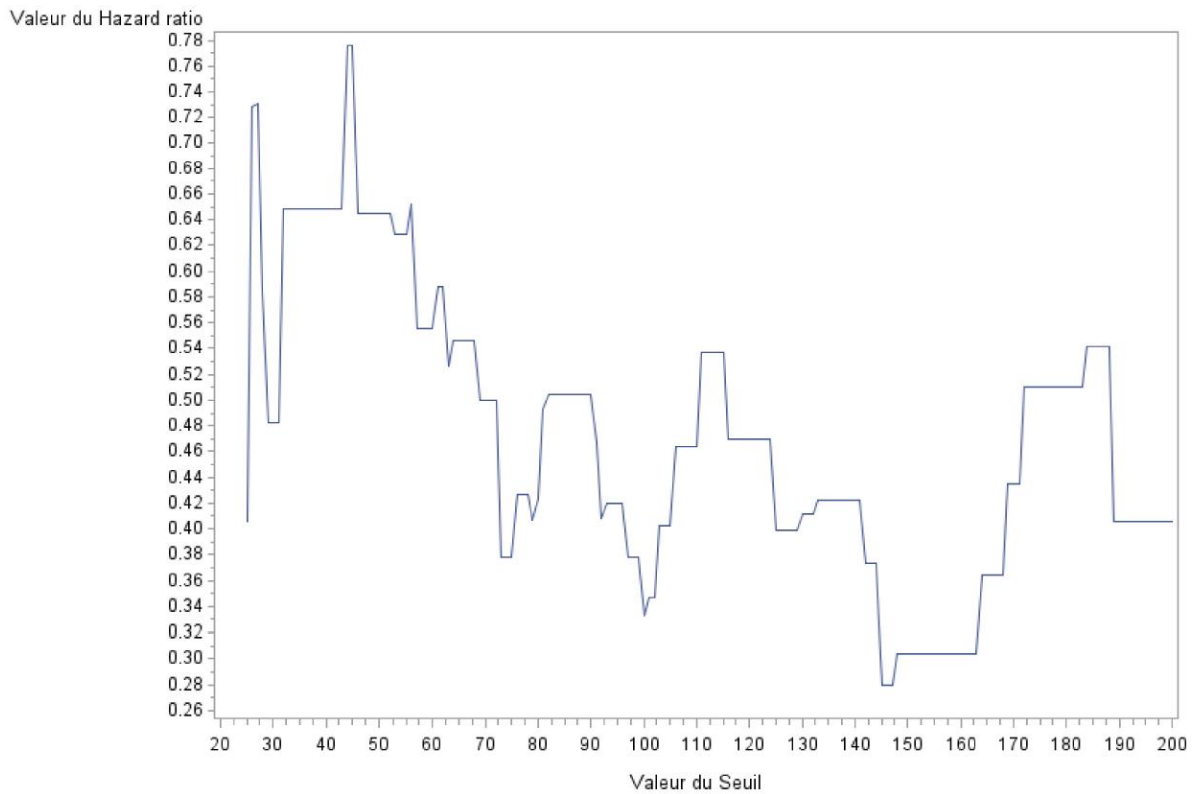


Figure 35. Valeur du Hazard ratio entre la SRC et la survie des patients atteints de LAM. Le Hazard ratio est exprimé en fonction de la valeur de chaque seuil utilisé.

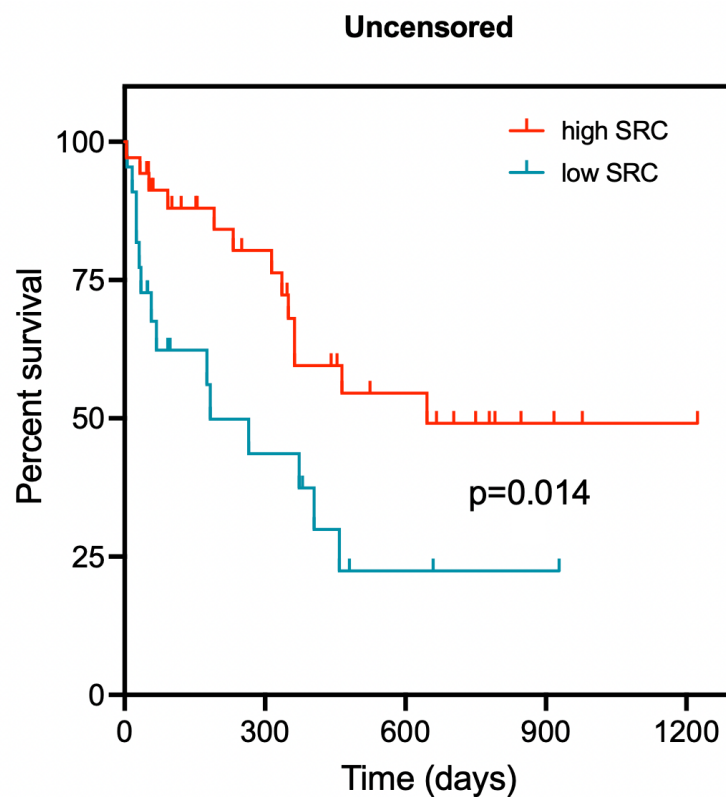


Figure 36. Survie globale des patients high et low SRC non censurée. Les résultats présentés sont exprimés en pourcentage de survie. (n= 58 patients; high SRC n=24 ; low SRC n=34).

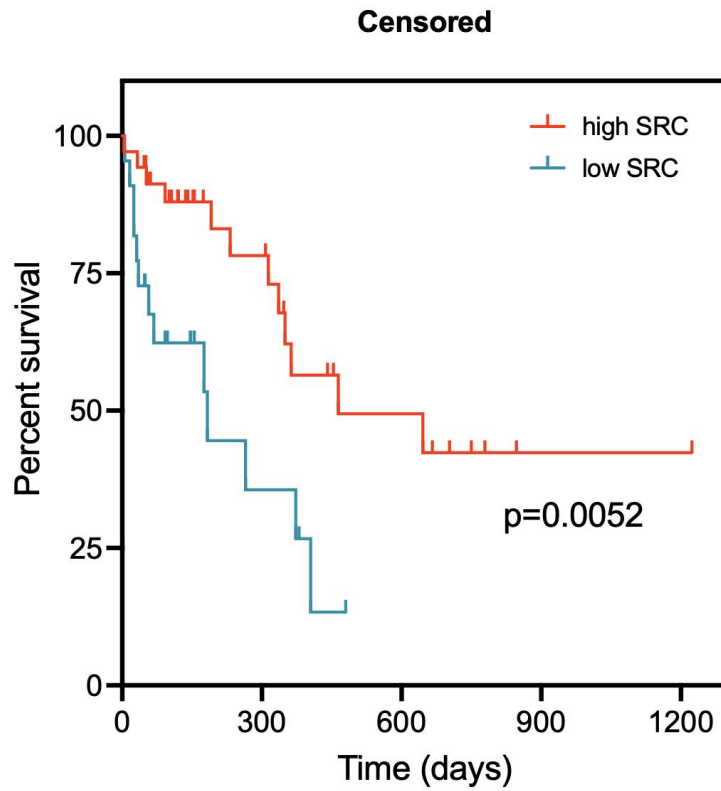


Figure 37. Survie globale des patients high et low SRC après censure post-greffe. Les résultats présentés sont exprimés en pourcentage de survie. (n=58 patients; high SRC n=24 ; low SRC n=34).

Annexe 4 : Article - ANTIMETABOLIC COOPERATIVITY WITH THE CLINICALLY-APPROVED L-ASPARAGINASE AND TYROSINE KINASE INHIBITORS TO ERADICATE CML STEM CELLS.

(En revision favorable dans Molecular Metabolism)

Anne Trinh*, Raeeke Khamari*, Quentin Fovez*, François-Xavier Mahon**, Béatrice Turcq**, Didier Bouscary[§], Patrice Maboudou⁺⁺, Marie Joncquel⁺⁺, Valérie Coiteux*, Nicolas Germain*, William Laine*, Salim Dekiouk*, Sandrine Jean-Pierre[£], Veronique Maguer-Satta[†], Bart Ghesquiere[‡], Thierry Idziorek*, Bruno Quesnel*, Jerome Kluza*[#] and Philippe Marchetti*^{++#}

AT, RK and QF contributed equally to this work.

[#]JK and PM shared equally co-ownership to this work

* Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut de Recherche contre le Cancer de Lille, UMR9020 – UMR-S 1277 - Canther – Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France

** Institut Bergonié, Université de Bordeaux, CNRS SNC5010, Inserm, U1218 ACTION F – 33076 Bordeaux, France

⁺ Université de Paris, Institut Cochin, CNRS UMR8104, INSERM U1016, Paris, France

⁺⁺ Centre de Bio-Pathologie, Banque de Tissus, CHU Lille, France

[§] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris. Centre-Université de Paris, Service d'Hématologie clinique, Hôpital Cochin, Paris, France

[‡] Department of Oncology and VIB, KU Leuven, Leuven, Belgium.

[£] Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Inserm U1052, CNRS UMR5286, Centre Léon Bérard 69008, Lyon, France

[†] Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Inserm U1052, CNRS UMR5286

Running title: Targeting mitochondria and glycolysis to kill CML stem cells

Corresponding author: Prof. Philippe MARCHETTI MD, PhD

Institut de Recherche contre le Cancer de Lille

UMR9020 – UMR-S 1277

F-59000 Lille, France

E-mail: philippe.marchetti@inserm.fr

or

Dr. Jerome Kluza PhD

Institut de Recherche contre le Cancer de Lille

UMR9020 – UMR-S 1277

F-59000 Lille, France

E-mail: jerome.kluza@inserm.fr

The authors declare no potential conflicts of interest.

Abbreviations: CML (chronic myeloid leukemia), TKI (tyrosine kinase inhibitors), BCR-ABL1 (B Cell Receptor-Abelson), LSC (leukemic stem cell)

This work received a financial support from INSERM, UNIVERSITE DE LILLE, Ligue contre le Cancer (to PM and JK), a special financial support from the Association pour l'Etude des Anomalies Congénitales Neurodev of Pr. B. Poupard (to PM). AT is a recipient of a CHRU Lille -Région Nord-Pas de Calais fellowship. RK and QF are recipients of a University of Lille fellowship.

This manuscript contains: abstract, 199 words; main text, 3733 words; 6 figures present in the manuscript, and one supplemental file containing 6 Figures and legends, one complementary methods, one Table associated to the manuscript.

Abstract

Long-term treatment with tyrosine kinase inhibitors (TKI) represents an effective treatment for chronic myeloid leukemia (CML) and discontinuation of TKI therapy is now proposed to patient with deep molecular responses. However, evidence demonstrating that TKI are unable to fully eradicate dormant leukemic stem cells indicate that new therapeutic strategies are needed to prevent molecular relapses. We investigated the metabolic pathways responsible for CML surviving to Imatinib exposure and its potential therapeutic utility to improve the efficiency of TKI against CML stem cells. Using complementary cell-based techniques, we demonstrated that TKI suppressed glycolysis in a large panel of BCR-ABL1 + cell lines as well as in primary CD34+ stem-like cells from CML patients. However, compensatory glutamine-dependent mitochondrial oxidation supported ATP synthesis and CML cell survival. Glutamine metabolism was inhibited by L-asparaginases such as Kidrolase without inducing predominant CML cell death. Clinically relevant concentrations of TKI render CML progenitors and stem cells susceptible to Kidrolase. The combination of TKI with L-asparaginase reactivated the intrinsic apoptotic pathway leading to efficient CML cell death. Thus, targeting glutamine metabolism with the clinically-approved drug Kidrolase, in combination with TKI that suppress glycolysis represents an effective and widely applicable therapeutic strategy for eradicating CML stem cells.

Keywords: synthetic lethality, metabolic addiction, LSC, metabolic stress, stem-like cells.

Introduction

With the development of tyrosine kinase inhibitor (TKI) therapy, the outcome of chronic myeloid leukemia (CML) patients has changed drastically. Unfortunately, TKI, such as Imatinib mesylate and other second or third generation of BCR-ABL1 inhibitors, target preferentially differentiated cells and leave some of the CML stem cells alive [1-4]. Indeed, a fraction of LSC can survive independently of BCR-ABL1 signaling and thus are totally insensitive to Imatinib [2,5]. TKIs are effective in inducing a long-term response and discontinuation of treatment is proposed to patients with a persistent deep molecular response [1,3,6,7]. The STIM study (Multicenter, non randomized Stop Imatinib Trial) has shown that 40% of patients successfully achieved treatment free remission with no recurrence of the disease. However, resumption of treatment is necessary for patients who exhibit BCR-ABL1 transcript increase following Imatinib discontinuation. The inability of TKI to kill LSCs and/or progenitor cells is at the origin of relapses [5,8,9]. Thus, strategies to improve the efficiency of TKI against LSC in CML are needed to definitely eradicate the disease and allow long definitive TKI discontinuation in most patients.

Cancer cell metabolism has opened up a new avenue in cancer treatment because it appears possible to target specific metabolic features of cancer cells, thus providing a potential therapeutic window. Indeed, many oncogenes and oncogenic pathways that drive cancer development also drive metabolism. Classically, it is assumed that cancer metabolism is dependent on glycolysis that is predominant even in normoxic conditions (a phenomenon also called the Warburg effect). Thus, the aberrant activation of the MAPK pathway via the BRAFV600E mutation increases glucose uptake and glycolysis allowing intense cell proliferation (for review [6,7,10]). Consistent activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway by BCR-ABL1 also increases glucose metabolism in leukemic cells [8,9,11]. Given these observations, it is not surprising that the exposure to oncogenic “driver” inhibitors such as BRAFV600E inhibitors [7,10] or BCR-ABL1 inhibitors [11,12] dramatically reduces glucose uptake and glycolysis to promote cell cycle arrest.

However, it has become evident that cancer metabolism cannot be resumed to the Warburg effect and represents a more complex network linking glucose metabolism and others nutrients such as glutamine. Thus, numerous evidence indicate that mitochondrial oxidative metabolic pathways have a crucial role in cancer development particularly to immediately compensate for glucose deprivation. Interestingly, the dependence on mitochondrial oxidative metabolism allows cells to avoid cell death induced by MAPK inhibitors [7,13] or TKI [6,12]. Moreover, CML stem cells are particularly sensitive to mitochondrial oxidative metabolism inhibitors [13,14]. Thus, one interesting therapeutic strategy in cancer could be the combination of molecular-targeted drugs with antiglycolytic activities and inhibitors of the compensatory mitochondrial oxidative pathways thereby creating an “antimetabolic cooperativity” [6,15]. Herein, our objective was to develop a pre-clinical proof of concept of antimetabolic cooperativity against CML stem cells. We demonstrated that the combination

of Kidrolase, a L-asparaginase used as treatment of acute lymphoblastic leukemia, with Imatinib possesses antimetabolic cooperativity and acts synergistically to eradicate CML stem cells *in vitro* and *ex vivo*.

Materials and methods

Chemicals

Imatinib mesylate was purchased from Sigma-Aldrich, Nilotinib and Dasatinib were purchased from Selleckchem. Kidrolase and Erwinase were provided by CHU Lille, [¹³C₆] Glucose and [¹³C₅] Glutamine were obtained from Professor Bart Ghesquière.

Patients samples

CML samples were blood or bone marrow samples obtained from individuals in chronic or acute phase CML recruited from the Department of Haematology (Lille CHU, France), with informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki and approval of the institutional ethical committee (CPP Lille). CD34⁺ cells were isolated from umbilical cord blood using the EasySep™ Human CD34 Positive Selection Kit II (Stemcell Technologies). Cytapheresis of CML patients were kindly provided by Pr. François-Xavier Mahon (CHU Bordeaux, France). CD34⁺ cells were cultivated at 37°C and 5% CO₂ in RPMI medium (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco), 50 U/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin, and a growth factor cocktail containing 10 ng/ml of interleukins (IL)-3, (IL)-6, (IL)-7 and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), 5 ng/ml of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), and 25 ng/ml of stem cell factor (SCF) (Peprotech).

Cell lines

The leukemic DA1-3b cell line was generated by stable transfection of BCR-ABL1 [14, 16] [14, 15] [15, 16]. Isolation of tumor cells d60 and d365 have been described previously [14, 16] [15, 17] [16, 17]. K562, KCL-22 and KU812 cell lines were grown in the same conditions. MS-5 mesenchymal cells were grown in α -MEM medium w/o nucleosides (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum, 50 U/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine and 2 mM pyruvate. The identity of HBL, LND, and Mel-4M was also confirmed by karyotyping and array comparative genomic hybridization testing.

OCR and ECAR measurement, determination of cellular ATP

Extracellular acidification rate measurements (ECAR) and oxygen consumption rate (OCR) were measured using the Seahorse XFe24 analyzer (Seahorse Bioscience, Billerica, MA, USA). Detailed methods are provided in Supplementary Information files.

Colony forming cell (CFC) assay

Clonogenic assay was realized with cells seeded into 35mm petri dish in semi-solid methylcellulose medium (Methocult™ M3231 for murin cells or Methocult™ H4230 for human cells, Stemcell Technologies). Cells were treated with the drugs for 72 hrs and centrifugated. Pellet was resuspended in Iscove's modified Dulbecco medium (Lonza) supplemented with 2% fetal calf serum and 50 U/ml

penicillin, 50 mg/ml streptomycin at 10 000 cells/ml, and cell suspension was added to methylcellulose medium (1000 cells/1ml/dish) and left at 37°C and 5% CO₂. Colony forming efficiency was determined after 7 days using Leica DMI8 inverted microscope (Leica Micro systems) and quantified using Image J software.

Metabolite flux

Two hundred thousand cells were supplemented with media containing uniformly labelled U-¹³C₆ glucose (25 mM) or ¹³C-glutamine (2 mM) for 24 hrs. Detailed methods are provided in Supplementary Information files.

Immunoblot analysis and Real-time quantitative reverse transcription

For immunoblot, cell lysates were prepared as described previously [14,17] Quantitative detection of mRNA was performed by real-time PCR using the Lightcycler 480 detector (Roche Applied Science, Mannheim Germany) as previously published [15,17].

Amino acid measurements

Amino acids concentration assay (μmol/l) was performed by high-performance liquid chromatography (Shimadzu C18 column, Kyoto, Japan) associated with tandem mass spectrometry (Sciex 3200 Qtrap, Framingham, MA) using the aTRAQ kit for amino acid analysis of physio-logical fluids (Sciex). Acquisition in the mass spectrometer was achieved by multiple reaction monitoring. Data recording and analysis were performed with Analyst software, v.1.6 (Sciex). Internal controls were systematically analyzed for each series of samples.

In vivo Studies

The DA1-3b/C3H mouse model of tumor dormancy has been described previously [14,16] [9, 15, 18] [11,16]Seven- to eight-week-old C3H/HeOuJ female mice (Charles River Laboratories, Lyon, France) were intraperitoneally injected with 1×10^6 DA1-3b, DA1-3b d60 or DA1-3b/d365. All animal experiments were approved by the Animal Care Ethical Committee CEEA.NPDC (agreement no. 2017022716306305).

Statistical analysis

All data points are represented as means \pm SD. Two-tailed Student's t test was used to compare mean values between two groups. One-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's or Sidak post hoc testing was used to compare mean values between multiple groups. Statistical analysis was performed using Prism version 6.0f (GraphPad Software, La Jolla, CA). $P < 0.05$ were statistically significant.

Results

Metabolic organization of CML involves both glycolysis and glutamine dependent mitochondrial OXPHOS.

We first compared the metabolism of DA1-3b leukemic cells expressing BCR-ABL1 to the isogenic cell line DA1 that does not express BCR-ABL1 (Fig. 1A-1C). There was a significant increase in both glycolysis (as judged by ECAR and gene expression) (Fig. 1A and 1B) as well as mitochondrial respiration (Fig. 1C) in cells transfected with p210 BCR-ABL1 compared to control cells. In BCR-ABL1-expressing DA1-3b cells, the mitochondrial respiration was largely sustained by glutamine (Fig. 1D) indicating that CML cells consume both glucose and glutamine. In the presence of glutamine, glucose and pyruvate, DA1-3b exhibited the highest proliferative rates (Fig. 1E). Under conditions of glucose or glutamine deprivation, DA1-3b cells were still able to proliferate although at a lower rate than in conditions with both nutrients (Fig. 1E). Glucose or glutamine starvation did not induce obvious increase in cell death but promoted G0/G1 cell cycle arrest (Fig. 1F). This result is consistent with the observation that inhibition of either glycolysis with 2DG or mitochondrial respiration with oligomycin A was insufficient to totally deplete DA1-3b (Fig. 1G, left panel) or primary CD34⁺ leukemic (Fig. 1G, right panel) cells in ATP. This is probably due to the development of compensatory mechanisms to prevent energy collapse. These results suggest that CML cells possess metabolic flexibility to survive for periods of carbon sources deprivation. Finally, only the inhibition of the two metabolic pathways depleted cells in ATP and was able to kill BCR-ABL1 expressing cells. All together, these results strongly suggest that only the depletion of carbon sources, glucose and glutamine, are required for energy crisis and subsequent CML killing.

Upon Imatinib exposure BCR-ABL1⁺ cells are dependent on mitochondrial metabolism for survival.

Previous studies have shown that Imatinib displays a sustained inhibitory effect on glucose uptake and glycolysis through a reduction in the expression of key proteins such as GLUT-1 or PKM2 [9,18-20]. In the current study, we examined specifically the metabolism of leukemic cells that survive to Imatinib exposure at sub-lethal (Supplementary Fig. S1A-D), and clinical relevant anti-proliferative concentrations [11,21]. At concentration below 0.2 μ M, Imatinib induced a strong antiproliferative effect in DA1-3b cells (Supplementary Fig. S1A) but did not induce mitochondrial apoptosis as seen by the absence of translocation of phosphatidyl-serines, the maintain of high mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) and the low level of mitochondrial ROS (Supplementary Fig. S1 B-E).

We performed metabolic flux analysis using ¹³C-labeled glucose in CML cells treated with vehicle or Imatinib for 24 hours before the incubation with labeled glucose. Cells treated with Imatinib displayed important impairment of glucose uptake and glycolysis as judged by the decrease in labeled glycolytic intermediates and labeled lactate (Fig. 2A). Moreover, it was accompanied by a reduction in the glucose flux through the nonoxidative pentose phosphate pathway (Fig. 2A). In agreement with the

inhibition of glucose uptake and lactate production (supplementary Fig. S2A and S2B), we also observed a decrease in glycolysis-associated protein expression (supplementary Fig. S2C), as well as a decrease in ECAR in BCR-ABL1+ leukemic cells exposed to Imatinib (Fig. 2B) or to other clinical BCR-ABL1 inhibitors (Fig. 2C). Despite the decrease in glycolysis, Imatinib exposure did not deplete in the high-energy molecule, ATP indicating that cells that survive to Imatinib can maintain energy state in the absence of efficient glycolysis (Fig. 2D). This situation is compatible with the maintenance of mitochondrial metabolism despite Imatinib exposure, despite a slight decrease in basal OCR under TKI treatment (supplementary Fig. 2E). To explore whether glutamine was used to fuel mitochondrial activity in such conditions, we cultured cells in [13C5] L-glutamine in the presence or absence of Imatinib and analyzed intracellular metabolites by mass spectrometry. As shown in Figure 2E, cells that survive to Imatinib continued to use glutamine to produce the TCA intermediates alphaKetoGlutarate in the absence of efficient glycolysis (Fig. 2B). Thus, we observed that leukemic cells exposed to Imatinib used glutamine-dependent mitochondrial activity to survive. Indeed, these cells became highly sensitive to the withdrawal of glutamine but not asparagine (Fig. 2F). Thus, to survive to Imatinib, BCR-ABL1+ cells require glutamine-derived carbon that maintains the TCA cycle in the absence of glycolysis.

L-asparaginases inhibit glutamine metabolism and reduce leukemic cell growth but are insufficient to eradicate BCR-ABL1+ cells.

We have previously demonstrated that targeting glutamine metabolism has potential anti leukemic effects on myeloid leukemia cells [19,20,22]. Therefore, we sought to target glutamine addiction in Imatinib-surviving BCR-ABL1+ cells. L-asparaginases (*e.g.* the *E.coli-asparaginase*, Kidrolase) are used to treat pediatric and adult forms of acute lymphoblastic leukemia and are also used in pediatric AML. These therapeutically relevant components are able to deaminate L-asparagine into aspartate. These enzymes also deplete glutamine and the antileukemic activity correlates with their ability to deplete extra cellular asparagine better than glutamine at lower dose, and to deplete both amino acids at higher dose [21,23]. Consequently, we studied the metabolic effects of the FDA-approved Kidrolase in BCR-ABL1 + leukemic cells (Fig. 3). In conditions that deplete extracellular glutamine and asparagine (Fig. 3A-3B and Supplementary Fig. S3A), the flux experiment indicates that L-asparaginase depleted drastically the anaplerotic flux of glutamine into the TCA in BCR-ABL1+ cells (Fig. 3C). This was accompanied by a significant reduction in OCR (Fig. 3D-E) confirming that glutamine is a major energy source to fuel mitochondrial respiration in BCR-ABL1+ cell lines, but also in CD34+ CD38- leukemic cells from CML patients. As a result of mitochondrial inhibition, Kidrolase displayed strong antiproliferative effects without predominant cytotoxic activity in BCR-ABL1+ cells (supplementary Fig. S3B and Fig. S3G). This absence of important cell death in BCR-ABL1+ cells was compatible with the maintenance of high ATP level in Kidrolase-treated cells (Fig. 3F). Strikingly, L-asparaginase increased intracellular glycolytic intermediates in BCR-ABL1+ cells

(Fig. 3G). Next, we tested whether the increase of glycolysis upon Kidrolase treatment allows leukemic cells to cope with metabolic stress. We found that the compensatory increase in glycolysis supported the survival of cells exposed to Kidrolase since inhibition of glycolysis with 2DG synergized with Kidrolase in inducing BCR-ABL1+ cell death (Fig. 3H). To determine whether the sensitivity to Kidrolase is a general feature of leukemic cells, we tested a large panel of BCR-ABL1 + or - leukemic myeloid cell lines. The antileukemic effects of Kidrolase were dose dependent and occurred in all tested cell lines. However, the antileukemic responses were highly heterogeneous in term of cell death observed up to 72h (supplementary Fig. S3C). Accordingly, we discovered an inverse correlation between glycolysis and Kidrolase-induced leukemic cell death (Fig. 3I). Thus, the FDA-approved glutamine inhibitor Kidrolase hinders glutamine-dependent mitochondrial metabolism but are insufficient to eradicate BCR-ABL1+ cells due to glycolytic compensation.

Dual treatment with Imatinib and Kidrolase significantly induces death of BCR-ABL1+ leukemic cells.

Given the metabolic flexibility of BCR-ABL1+ cells observed above, we hypothesized that the combination of Imatinib and L-asparaginases such as Kidrolase could be of therapeutic interest blocking both glycolysis and mitochondrial metabolism. Metabolic flux analyses indicate that cells treated with the combination of Imatinib and Kidrolase caused much more impairment of the carbon flux into the TCA cycle, than either drug alone (Fig.4A right panel). This decrease of TCA activity was not linked to modification of respiratory chain protein expression as seen by immunoblot of several proteins of each complex (supplementary Fig. 3E). The combination of drugs also impeded the glycolytic flux with efficiency (Fig. 4A left panel). In BCR-ABL1+ cell lines, Kidrolase synergized with Imatinib to induce cell death (Fig. 4B-4C and supplementary 3F). The combination of Imatinib with Kidrolase enhanced cell death by potentiating the intrinsic pathway of apoptosis through the downregulation of Bcl-2 and Bcl-XL protein levels and Bim upregulation (Fig. 4D). The combination of Kidrolase and Imatinib exhibited the most pronounced killing effect in comparison to the association of Kidrolase and other anti-leukemic drugs (daunorubicin or idarubicin) (Fig. 4E). Kidrolase acted in synergy with Imatinib in BCR-ABL1 + leukemia cells even when cells were cultured on the MS5 stroma cell line (Fig. 4F) or in hypoxic conditions (Fig. 4G), situations known to protect leukemia cells from the effects of L-asparaginase [15,22] or to Imatinib [23,24]. These results suggest that Imatinib plus Kidrolase elicit death synergistically in BCR-ABL1 + leukemic cells.

Imatinib synergized with Kidrolase to eradicate BCR-ABL1+ persistent stem cells and leukemia-initiating cells in CML patients

Next, we explored the potential of the synergistic combination of Imatinib plus Kidrolase against subpopulations of short-term relapse-inducing CML cells. First, the subpopulation of cells that survived in the presence of Imatinib for 7 days was enriched in persistent (Fig. 5A) and withdrawal of Imatinib lead to proliferation of blast cell clones (Fig. 5B). This persistent population which survived

during TKI exposure presented high level of mitochondrial metabolism as determined by their mitochondrial potential, mitochondrial mass and the overproduction of mitochondrial ROS (Fig. 5C). To confirm the predominant role of mitochondrial metabolism, we isolated two populations characterized by low ($\Delta\psi_m$ low) or high mitochondrial ($\Delta\psi_m$ high) membrane potential using cell sorting. As expected, the percentage of persistent leukemia cells was higher in $\Delta\psi_m$ high DA1-3b cells in comparison with $\Delta\psi_m$ low cells, whereas the combination of Imatinib and Kidrolase is efficient to eradicate both subpopulations. Finally, we showed that Erwinase, another L-asparaginase, also synergized also with Imatinib to kill persistent BCR-ABL1+ cells (Fig. 5E).

Next, we studied the effect of this drug association on long-term persistent BCR-ABL1+ cells originated from a mouse model of *in vivo* leukemia dormancy [9,15]. In our model, the DA1-3b/d60 and DA1-3b/d365 cells were derived from the BCR-ABL1 + DA1-3b cells injected in mice and isolated after 2 months or 1 year of tumor dormancy, respectively [18,24] (Fig. 6A). DA1-3b/d60 and DA1-3b/d365 were injected intraperitoneally in mice to develop a lethal leukemia (Fig. 6B). As expected, death of DA1-3b/d60 and DA1-3b/d365-bearing mice was delayed in comparison with DA1-3b WT mice, confirming the maintenance *in vivo* of the dormant phenotype (Fig. 6B). Persistent-leukemic DA1-3b/d60 and DA1-3b/d365 cells were completely refractory to Kidrolase monotherapy and also partially resistant to treatment with Imatinib (Fig. 6C and 6D). However, the combination of both two drugs eradicated long-term persistent cells as judged by the induction of apoptosis (annexin V staining) (Fig. 6D) and the loss of colony-forming potential (Fig. 6E). Indeed, Kidrolase in combination with Imatinib reduced colony formation of DA1-3b cells by more than 90 % compared to Imatinib alone (Fig. 5E). Then, we assessed the *ex vivo* effects of Kidrolase plus Imatinib in different CD34+ and CD38- subpopulations of primary CML CD34+ progenitor cells (freshly collected from newly diagnosed patients) (n=4; Fig. 6G and supplementary Fig. S4) and from 6 cryopreserved primary CML cells from patients at diagnosis (supplementary Fig. S5). We show that the killing effect was more pronounced on the stem cell-enriched CD34+ CD38- subpopulation as compared to more differentiated CML cells (Fig. 6G and supplementary Fig. S4). Importantly, and as expected, the combination had no effect on CD34+ progenitor cells from healthy individuals (n=2; Fig. 6F). Finally, we used LTC-IC assays to confirm that cells surviving BCR-ABL inhibition retained the *in vitro* functional capacity of stem cells. As seen in Fig. 6H and supplementary Fig. S6, we confirmed the efficacy of Kidrolase in combination with Imatinib in reducing the stem cell potential of primary CML cells

Thus, the combined use of Imatinib and Kidrolase synergistically increase selective cytotoxicity in CML stem cells.

Discussion

We have characterized the metabolic effects of the FDA-approved drug Kidrolase in association with TKI in myeloid leukemia and demonstrated that they displayed synergistic antimetabolic effects that eradicate CML stem cells. It is well established that TKI such as Imatinib possess potent anti-Warburg effect. Imatinib efficiently hampers glucose metabolism through the reduction of GLUT-1 surface localization [6,9], inhibition of BCR-ABL1-mediated PKM2 phosphorylation or the modulation of PKM isoforms [18]. However, inhibition of glycolysis alone is often insufficient to eradicate cells due to compensatory activating metabolic pathways [6,13]. Upon Imatinib exposure, mitochondrial oxidative metabolism is maintained at high levels due to fatty acid [18,25] and/or glutamine oxidation (Fig. 2). This suggests that remaining TKI-tolerant cells become addicted to mitochondrial activity for survival [13,25]. In agreement with our results, mitochondrial metabolism is spared by FLT3^{ITD} TK inhibitors in myeloid cells [25,26]. The mechanisms that result from a glycolytic metabolism shift toward oxidative metabolism remain largely unknown. However, we and others [25,27] have observed a significant increase in mitochondrial mass upon TKI exposure suggesting important changes in mitochondrial biogenesis. As a consequence of mitochondrial addiction, TKI-tolerant cells were highly sensitive to the antileukemia effects of mitochondrial targeting drugs. Myeloid leukemia present numerous mitochondrial-druggable targets [25,26,28-30]. Thus, the CPT1 (carnitine O-palmitoyltransferase 1) inhibitors that reduce fatty acid oxidation and mitochondrial OXPHOS decreased significantly the number of quiescent leukemia progenitor cells [27,31]. The combination of mitochondrial drugs and TKI consists in a rational approach that considers complementary mechanisms of action as the therapeutic aim. TKI and mitochondrial inhibitors address the two compensatory aspects of the metabolism, glycolysis and mitochondrial oxidation that none of the monotherapy can achieve alone to kill leukemia cells. Several preclinical studies evidenced that TKI, such as inhibitors of FLT3^{ITD} can synergize with mitochondrial inhibitors leading to potent antileukemia effects [13,25,28-30]. Interestingly, inhibition of the mitochondrial “booster” STAT3, [25,31] or of mitochondrial translation [13,29] synergize with BCR-ABL1 inhibitors in CML. Here, we completed the frame including the inhibition of glutamine-dependent mitochondrial metabolism. Genetic and pharmacological inhibition of the first enzyme in glutamine metabolism is synthetically lethal with FLT3-ITD-TKI in myeloid leukemia cells [25,32]. This effect seems related to the depletion of glutathione, enhancement of mitochondrial oxidative stress resulting in leukemia cell death [29,30]. We have used L-asparaginase to deplete extracellular glutamine and therefore mitochondrial metabolism. To best translate *in vitro* results into clinical application, we have chosen the existing FDA-approved drug Kidrolase. However, L-asparaginase use in the clinic is associated with a number of dose-dependent toxicities [32,33]. When combined with TKI, L-asparaginase should be less toxic since exposure to BCR-ABL1 inhibitors specifically increases the sensitivity of BCR-ABL1+ cells to mitochondrial targeting drugs (results and [30,34]). Imatinib has already been added to intensive combination chemotherapy which included asparaginase to treat newly diagnosed

Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia (KH-Lee, Leukemia 2005). Toxicities of the combined treatment were manageable and included grade 4 myelosuppression (with severe neutropenia) and reversible grade 3 hyperbilirubinemia which was more likely due to treatment with L-asparaginase alone. So it is probable that the toxicities of the combination could be mainly attributed to the effects of L-Asparaginase.

As demonstrated (Fig. 3A), L-asparaginase depleted the extracellular AA, glutamine and asparagine. Several studies uncovered a crucial role of asparagine in cancer cell growth and proliferation [33,35] as well as cell survival to glutamine deprivation [34,36]. Thus, asparagine is required for anabolism and cell proliferation in the absence of glutamine [13,35,37,38]. For these reasons, the synergistic effect of L-Asparaginase observed here is probably based on the depletion of both extracellular asparagine and glutamine. It is noteworthy that LSCs relies on AA including glutamine and glutamate to maintain OXPHOS for survival [36].

Targeting mitochondrial metabolism has been proposed as a therapeutic approach against CML stem cells [13,37,38]. Recently a therapeutic drug combination targeting mitochondrial metabolism has demonstrated efficacy against LSCs in patients with AML [2,4,39]. Accordingly, we have shown that both glycolysis and glutamine-dependent mitochondrial metabolism had to be impaired to eradicate LSCs. Targeting compensatory pathways of glutamine metabolism in CML stem cells can improve the efficacy of cancer treatments that impair glucose utilization. Thus, we have provided pre-clinical evidence that the antimetabolic cooperativity by the combination of oncogene tyrosine kinase inhibitors and mitochondrial inhibitors constitutes a novel interesting therapeutic approach to eradicate LSC. This antimetabolic strategy is able to target CML stem cells and could therefore limit therapeutic failure in patients following the discontinuation of TKI therapy.

References

- [1] Rousselot, P., Charbonnier, A., Cony-Makhoul, P., Agape, P., Nicolini, F.E., Varet, B., et al., 2014. Loss of major molecular response as a trigger for restarting tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with chronic-phase chronic myelogenous leukemia who have stopped imatinib after durable undetectable disease. *Journal of Clinical Oncology* 32(5): 424–30, Doi: 10.1200/JCO.2012.48.5797.
- [2] Corbin, A.S., Agarwal, A., Loriaux, M., Cortes, J., Deininger, M.W., Druker, B.J., 2011. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *The Journal of Clinical Investigation* 121(1): 396–409, Doi: 10.1172/JCI35721DS1.
- [3] Rea, D., Ame, S., Berger, M., Cayuela, J.-M., Charbonnier, A., Coiteux, V., et al., 2018. Discontinuation of tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia: Recommendations for clinical practice from the French Chronic Myeloid Leukemia Study Group. *Cancer*: 2956–63, Doi: 10.1002/cncr.31411.
- [4] Redner, R.L., 2010. Why Doesn't Imatinib Cure Chronic Myeloid Leukemia? *The Oncologist* 15(2): 182–6, Doi: 10.1634/theoncologist.2009-0297.
- [5] Laneuville, P., 2018. When to Stop Tyrosine Kinase Inhibitors for the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia. *Current Treatment Options in Oncology*: 1–13, Doi: 10.1007/s11864-018-0532-2.
- [6] Marchetti, P., Guerreschi, P., Mortier, L., Kluza, J., 2015. Integration of Mitochondrial Targeting for Molecular Cancer Therapeutics. *International Journal of Cell Biology* 2015: 283145, Doi: 10.1155/2015/283145.
- [7] Marchetti, P., Trinh, A., Khamari, R., Kluza, J., 2018. Melanoma metabolism contributes to the cellular responses to MAPK/ERK pathway inhibitors. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1862(4): 999–1005, Doi: 10.1016/j.bbagen.2018.01.018.
- [8] Kim, J.H., Chu, S.C., Gramlich, J.L., Pride, Y.B., Babendreier, E., Chauhan, D., et al., 2005. Activation of the PI3K/mTOR pathway by BCR-ABL contributes to increased production of reactive oxygen species. *Blood* 105(4): 1717–23, Doi: 10.1182/blood-2004-03-0849.
- [9] Barnes, K., McIntosh, E., Whetton, A.D., Daley, G.Q., Bentley, J., Baldwin, S.A., 2005. Chronic myeloid leukaemia: an investigation into the role of Bcr-Abl-induced abnormalities in glucose transport regulation. *Oncogene* 24(20): 3257–67, Doi: 10.1038/sj.onc.1208461.
- [10] Khamari, R., Trinh, A., Gabert, P.-E., Corazao Rozas, P., Riveros-Cruz, S., Balayssac, S., et al., 2018. Glucose metabolism and NRF2 coordinate the antioxidant response in melanoma resistant to MAPK inhibitors. *Cell Death and Disease* 9(3): 325, Doi: 10.1038/s41419-018-0340-4.

- [11] Gottschalk, S., Anderson, N., Hainz, C., Eckhardt, S.G., Serkova, N.J., 2004. Imatinib (STI571)-mediated changes in glucose metabolism in human leukemia BCR-ABL-positive cells. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research* 10(19): 6661–8, Doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0039.
- [12] Alvarez-Calderon, F., DeGregori, J., 2015. Oncogenic drivers and mitochondrial dependency. *Aging* 7(3): 148–9.
- [13] Kuntz, E.M., Baquero, P., Michie, A.M., Dunn, K., Tardito, S., Holyoake, T.L., et al., 2017. Targeting mitochondrial oxidative phosphorylation eradicates therapy-resistant chronic myeloid leukemia stem cells. *Nature Medicine* 23(10): 1234–40, Doi: 10.1038/nm.4399.
- [14] Saudemont, A., Buffenoir, G., Denys, A., Desreumaux, P., Jouy, N., Hetuin, D., et al., 2002. Gene transfer of CD154 and IL12 cDNA induces an anti-leukemic immunity in a murine model of acute leukemia. *Blood* 100(9): 1637–44, Doi: 10.1038/sj.leu.2402590.
- [15] Saudemont, A., Quesnel, B., 2004. In a model of tumor dormancy, long-term persistent leukemic cells have increased B7-H1 and B7.1 expression and resist CTL-mediated lysis. *Blood* 104(7): 2124–33, Doi: 10.1182/blood-2004-01-0064.
- [16] Saudemont, A., Jouy, N., Hetuin, D., Quesnel, B., 2005. NK cells that are activated by CXCL10 can kill dormant tumor cells that resist CTL-mediated lysis and can express B7-H1 that stimulates T cells. *Blood* 105(6): 2428–35, Doi: 10.1182/blood-2004-09-3458.
- [17] Kluza, J., Jendoubi, M., Ballot, C., Dammak, A., Jonneaux, A., Idziorek, T., et al., 2011. Exploiting mitochondrial dysfunction for effective elimination of imatinib-resistant leukemic cells. *PloS One* 6(7): e21924, Doi: 10.1371/journal.pone.0021924.
- [18] Shinohara, H., Kumazaki, M., Minami, Y., Ito, Y., Sugito, N., Kuranaga, Y., et al., 2016. Perturbation of energy metabolism by fatty-acid derivative AIC-47 and imatinib in BCR-ABL-harboring leukemic cells. *Cancer Letters* 371(1): 1–11, Doi: 10.1016/j.canlet.2015.11.020.
- [19] Willems, L., Jacque, N., Jacquet, A., Neveux, N., Trovati Maciel, T., Lambert, M., et al., 2013. Inhibiting glutamine uptake represents an attractive new strategy for treating acute myeloid leukemia. *Blood* 122(20): 3521–32, Doi: 10.1182/blood-2013-03-493163.
- [20] Jacque, N., Ronchetti, A.M., Larrue, C., Meunier, G., Birsén, R., Willems, L., et al., 2015. Targeting glutaminolysis has anti-leukemic activity in acute myeloid leukemia and synergizes with BCL-2 inhibition. *Blood*: blood–2015–01–621870, Doi: 10.1182/blood-2015-01-621870.
- [21] Pieters, R., Hunger, S.P., Boos, J., Rizzari, C., Silverman, L., Baruchel, A., et al., 2011. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on *Erwinia asparaginase*. *Journal of Clinical Oncology* 29(2): 238–49, Doi: 10.1200/JCO.2010.32.25489.

- [22] Iwamoto, S., Mihara, K., Downing, J.R., Pui, C.-H., Campana, D., 2007. Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *The Journal of Clinical Investigation* 117(4): 1049–57, Doi: 10.1172/JCI30235.
- [23] Giuntoli, S., Tanturli, M., Di Gesualdo, F., Barbetti, V., Rovida, E., Sbarba, Dello, P., 2011. Glucose availability in hypoxia regulates the selection of chronic myeloid leukemia progenitor subsets with different resistance to imatinib-mesylate. *Haematologica* 96(2): 204–12, Doi: 10.3324/haematol.2010.029082.
- [24] Saudemont, A., Hamrouni, A., Marchetti, P., Liu, J., Jouy, N., Hetuin, D., et al., 2007. Dormant tumor cells develop cross-resistance to apoptosis induced by CTLs or imatinib mesylate via methylation of suppressor of cytokine signaling 1. *Cancer Research* 67(9): 4491–8, Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1627.
- [25] Gallipoli, P., Giotopoulos, G., Tzelepis, K., Costa, A.S.H., Vohra, S., Medina-Perez, P., et al., 2018. Glutaminolysis is a metabolic dependency in FLT3 ITD acute myeloid leukemia unmasked by FLT3 tyrosine kinase inhibition. *Blood*: blood–2017–12–820035, Doi: 10.1182/blood-2017-12-820035.
- [26] Farge, T., Saland, E., de Toni, F., Aroua, N., Hosseini, M., Perry, R., et al., 2017. Chemotherapy Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. *Cancer Discovery* 7(7): CD–16–0441, Doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-0441.
- [27] Samudio, I., Harmancey, R., Fiegl, M., Kantarjian, H., Konopleva, M., Korchin, B., et al., 2010. Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction 120(1): 142–56, Doi: 10.1172/JCI38942DS1.
- [28] Gregory, M.A., D'Alessandro, A., Alvarez-Calderon, F., Kim, J., Nemkov, T., Adane, B., et al., 2016. ATM/G6PD-driven redox metabolism promotes FLT3 inhibitor resistance in acute myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(43): E6669–78, Doi: 10.1073/pnas.1603876113.
- [29] Gregory, M.A., Nemkov, T., Reisz, J.A., Zaberezhnyy, V., Hansen, K.C., D'Alessandro, A., et al., 2018. Glutaminase inhibition improves FLT3 inhibitor therapy for acute myeloid leukemia. *Experimental Hematology* 58: 52–8, Doi: 10.1016/j.exphem.2017.09.007.
- [30] Alvarez-Calderon, F., Gregory, M.A., Pham-Danis, C., DeRyckere, D., Stevens, B.M., Zaberezhnyy, V., et al., 2015. Tyrosine kinase inhibition in leukemia induces an altered metabolic state sensitive to mitochondrial perturbations. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research* 21(6): 1360–72, Doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2146.

- [31] Eiring, A.M., Page, B.D.G., Kraft, I.L., Mason, C.C., Vellore, N.A., Resetca, D., et al., 2014. Combined STAT3 and BCR-ABL1 inhibition induces synthetic lethality in therapy-resistant chronic myeloid leukemia. *Leukemia*: –, Doi: 10.1038/leu.2014.245.
- [32] Koprivnikar, J., McCloskey, J., Faderl, S., 2017. Safety, efficacy, and clinical utility of asparaginase in the treatment of adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *OncoTargets and Therapy* 10: 1413–22, Doi: 10.2147/OTT.S106810.
- [33] Krall, A.S., Christofk, H.R., 2015. Rethinking glutamine addiction. *Nature Cell Biology* 17(12): 1515–7, Doi: 10.1038/ncb3278.
- [34] Zhang, J., Fan, J., Venneti, S., Cross, J.R., Takagi, T., Bhinder, B., et al., 2014. Asparagine plays a critical role in regulating cellular adaptation to glutamine depletion. *Molecular Cell* 56(2): 205–18, Doi: 10.1016/j.molcel.2014.08.018.
- [35] Pavlova, N.N., Hui, S., Ghergurovich, J.M., Fan, J., Intlekofer, A.M., White, R.M., et al., 2018. As Extracellular Glutamine Levels Decline, Asparagine Becomes an Essential Amino Acid. *Cell Metabolism* 27(2): 428–438.e5, Doi: 10.1016/j.cmet.2017.12.006.
- [36] Jones, C.L., Stevens, B.M., D'Alessandro, A., Reisz, J.A., Culp-Hill, R., Nemkov, T., et al., 2018. Inhibition of Amino Acid Metabolism Selectively Targets Human Leukemia Stem Cells. *Cancer Cell* 34(5): 724–4, Doi: 10.1016/j.ccell.2018.10.005.
- [37] Lagadinou, E.D., Sach, A., Callahan, K., Rossi, R.M., Neering, S.J., Minhajuddin, M., et al., 2013. BCL-2 Inhibition Targets Oxidative Phosphorylation and Selectively Eradicates Quiescent Human Leukemia Stem Cells. *Stem Cell*: 1–13, Doi: 10.1016/j.stem.2012.12.013.
- [38] Skrtić, M., Sriskanthadevan, S., Jhas, B., Gebbia, M., Wang, X., Wang, Z., et al., 2011. Inhibition of mitochondrial translation as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 20(5): 674–88, Doi: 10.1016/j.ccr.2011.10.015.
- [39] Pollyea, D.A., Stevens, B.M., Jones, C.L., Winters, A., Pei, S., Minhajuddin, M., et al., 2018. Venetoclax with azacitidine disrupts energy metabolism and targets leukemia stem cells in patients with acute myeloid leukemia 3: 730, Doi: 10.1007/s00726-015-2019-9.

Legends

Figure 1 – Glucose metabolism and mitochondrial respiration through glutamine oxidation are necessary for optimal metabolism and cell proliferation in CML cells. (A) Glycolytic activity and (C) oxygen consumption of BCR-ABL1+ (DA1-3b) and BCR-ABL1- (DA1) measured with Seahorse XFe24 extracellular flux analyzer after the injection of indicated drugs (Glc for glucose, Fc for FCCP, Oli for oligomycin A, 2DG for 2-deoxy-glucose, Rot/AA for rotenone and antimycin A) (n=3, * p < 0.05). (B) Glycolysis enzymes mRNA expression were quantified by RT-qPCR. 18S mRNA was used as housekeeping gene and data were expressed as mean of fold change (n=3, * p < 0.05). (D) DA1-3b leukemic cells were incubated in DMEM medium with glucose supplemented or not with glutamine for 24 hrs and oxygen consumption rate (OCR) was then measured. (E) DA1-3b cells were cultured in medium with or without glutamine, glucose or pyruvate as indicated. Proliferation was assessed by cell count from 1 to 5 days (mean +/-SD, n=3). (F) DA1-3b cells were cultured in medium with or without glutamine. After 24, 48 and 72 hrs, cell death was determined by measuring sub-G1 population using propidium iodide staining. Pictures are representative of three independent experiments. The percentages of cells belonging to each phase of the cell cycle (G1, S and G2/M) have been calculated using FlowJo software. (G) DA1-3b cells (left panel) and primary CD34⁺ leukemic cells isolated from CML patient blood (right panel) were untreated (co.) or treated with oligomycin A (1 μM), 2-DG (10 mM) and a combination of both molecules for 4 hrs. ATP content was measured by luminescence (mean +/-SD, n=3. * p < 0.05).

Figure 2 – BCR-ABL1+ cells exhibit mitochondrial addiction and glutamine dependency under TKI exposure. (A) Isotopolog quantification of glycolysis intermediates have been measured by liquid chromatography-mass spectrometry analysis in DA1-3b cells treated with Imatinib 0.2 μM (Im.) for 24 hrs or not treated (Co.) and grown in media containing U-13C₆ glucose (mean ± SD, n=3, *p=0.05). The symbol “m+” indicates the number of carbon atoms of each metabolite labeled with 13C. (B) Glycolytic activity (ECAR) of DA1-3b cells treated with Imatinib (0.01-1 μM) for 24 hrs measured with Seahorse XFe24 extracellular flux analyzer after the injection of indicated drugs (Glc for glucose, Oli for oligomycin A, 2DG for 2-deoxy-glucose) (C) Variations of glycolytic activity (ECAR) was determined after addition of inhibitors (Glc for glucose, Oli for oligomycin A, 2DG for 2-deoxy-glucose) using Seahorse XFe24 extracellular flux analyzer (left panel). Leukemic cells were treated by sub-lethal concentration of TKI of BCR-ABL1 (Imatinib 0.2 μM, PD180970 0.01 μM, Nilotinib 5 nM, Dasatinib 2 nM) for 24 hrs, and basal and maximal ECAR were assessed. Basal glycolysis and maximal glycolysis are measured following glucose or oligomycin injection respectively (mean +/-SD, n=3. * p < 0.05). (D) DA1-3b leukemic cells were treated with Imatinib (0.2 μM) for 72 hrs or with oligomycin A (1 μM) or/and 2-DG (10 mM) for 4 hrs. ATP levels were then measured by luminescence (mean +/-SD, n=3. * or # P < 0.05 respectively compared to control). (E) Isotopolog quantification of TCA cycle intermediates levels by liquid chromatography-mass

spectrometry analysis in DA1-3b cells grown in media containing U-13C₅ glutamine and treated or not with Imatinib (0.2 μM for 24 hrs) (mean ± SD, n=3, *p < 0.05). (F) DA1-3b cells were cultured in medium containing a combination as indicated of Imatinib (0.5 μM), glutamine (2 mM) and asparagine (4 mM) for 48 hrs. Necrosis and apoptosis were determined by flow cytometry analysis of Annexin V and Sytox blue staining (mean ± SD, n=3, *p < 0.05).

Figure 3 – Myeloid leukemic cells are able to survive to Kidrolase-induced glutamine depletion through glycolysis. (A) and (B) DA1-3b cells were cultured in medium containing Kidrolase 0.5 or 2 UI/mL (Kid.) for 24 hrs. Cells were centrifugated, supernatant was removed and amino acids concentration as indicated was measured by HPLC/MS. (C) Isotopolog quantification of TCA cycle intermediates levels has been measured by LC-MS analysis in DA1-3b cells grown in media containing U-13C₅ glutamine and treated or not with Kidrolase (0.5 UI/mL) for 24 hrs (mean ± SD, n=3, *p=0.05). The symbol ‘‘m+’’ indicates the number of carbon atoms of each metabolite labeled with 13C. (D) Assessment of mitochondrial respiration in DA1-3b cells by measuring OCR with XF24e Seahorse. The following molecules have been injected subsequently: drug (Kidrolase or vehicle control), oligomycin (Olig.), FCCP and rotenone/antimycine A (Rot/AA). (E) Assessment of mitochondrial respiration in CD34+ CD38+/- patient primary leukemic cell sub-population from 2 CML patients by measuring OCR with XFe24 Seahorse. The molecules have been injected as indicated: vehicle or Kidrolase. The percentages of inhibition of OXPHOS were calculated after 60, 120 and 180 min of exposure to kidrolase (mean ± SD, n=3, *p=0.05). (F) Intracellular ATP level of DA1-3b cells exposed to oligomycin (oli.), 2-deoxy-glucose (2DG) or a combination of the two inhibitors for 4 hrs, with or without 72 hrs pre-incubation with Kidrolase 1 UI/mL (mean ± SD, n=3, *p=0.05). (G) Isotopolog quantification of glycolysis intermediates measured by LC-MS analysis in DA1-3b cells treated with Kidrolase 0.5 UI/mL for 24 hrs and grown in media containing U-13C₆ glucose (mean ± SD, n=3, *p=0.05). (H) DA1-3b cells were cultured with combination of 2-DG (0.033 – 100 mM) and Kidrolase (0.00033 – 10 UI/mL) for 72 hrs and cell proliferation inhibition was quantified by fluorescence using CyQUANT Cell Proliferation Assay. The response of the combination was compared with its single agents against the widely used Loewe model for drug-with-itself dose additivity using Chalice software and presented as an isobologram. (mean ± SD, n=3, *p=0.05). (I) Correlation between maximal glycolytic activity determined by XFe24 Seahorse after glucose/oligomycin injection (ECAR Max) and cell death (determined by PI staining) induced by 48 hrs Kidrolase treatment (0.5 UI/mL) in 8 myeloid leukemic cell lines (p =0.002, R²=0.91).

Figure 4 – Imatinib and Kidrolase drug combination is effective to target glycolysis and mitochondrial metabolism and to induce cytotoxic effects. (A) Isotopolog quantification of glycolysis (left panel) and TCA cycle (right panel) intermediates calculated as percentage of the total metabolite pool following liquid chromatography-mass spectrometry in DA1-3b cells treated with Imatinib (0.2 μM) and Kidrolase (0.5 UI/mL) for 24 hrs and grown in media containing U-13C₆

glucose (left panel) or U- $^{13}\text{C}_5$ glutamine (right panel) ($n=3$). The symbol “m+” indicates the number of carbon atoms of each metabolite labeled with ^{13}C . (B) Determination of DA1-3b and K562 cell death after 48hrs exposure to Imatinib ($0.5\ \mu\text{M}$) and Kidrolase treatments as indicated (mean \pm SD, $n = 3$, * or # $p < 0.05$ respectively compared to control). (C) DA1-3b cells were cultured with combination of Imatinib ($0.0001 - 100\ \mu\text{M}$) and Kidrolase ($0.00033 - 10\ \text{UI/mL}$) for 72 hrs and cell proliferation inhibition was quantified by fluorescence using CyQUANT Cell Proliferation Assay). Isobologram have been determined as seen in Fig. 3. (D) Immunoblotting of pro- and anti-apoptotic proteins (as indicated) in DA1-3b cells treated with Imatinib ($0.5\ \mu\text{M}$), Kidrolase ($2\ \text{UI/mL}$) or a combination of both drugs for 24 hrs. Pictures are representative of three independent experiments. Actin was used as loading control. (E) DA1-3b cells were treated with a combination of Kidrolase and anticancer drugs (Imatinib $0.5\ \mu\text{M}$, Daunorubicin $0.01\ \mu\text{M}$, Idarubicin $0.001\ \mu\text{M}$) for 48 hrs and viability was assessed by cytometric analysis of annexin V and Sytox stainings. (F) Phase-contrast analysis of DA1-3b cells transfected with DsRed co-cultured with MS-5 mesenchymal cells and treated by Imatinib ($3\ \mu\text{M}$) and Kidrolase ($2\ \text{UI/mL}$) for 7 days (left panel). Viability of DA1-3b in mono-culture or in co-culture with mesenchymal cells after 48hrs treatments with Imatinib ($1-5\ \mu\text{M}$) and Kidrolase ($2\ \text{UI/mL}$) after Sytox blue stainings (right panel). Quantification was expressed as mean \pm SD ($n=3$, * $p=0.05$). (G) DA1-3b cell lines were exposed to Imatinib ($1\ \mu\text{M}$) and Kidrolase ($2\ \text{UI/mL}$) treatments in normoxia ($20\% \text{O}_2$) or hypoxia ($1\% \text{O}_2$) for 72 hrs. Viability was assessed by flow cytometry after PI stainings (mean \pm SD, $n = 3$, * $p < 0.05$).

Figure 5 – TKI and Kidrolase combination reduces Bcr Abl persistent cells following TKI treatment. (A) DA1-3b cells have been treated by Imatinib and viability has been assessed by cytometric analysis using Annexin V and sytox blue stainings. (B) DA1-3b cells have been treated by Imatinib for 7 days and medium has been changed for Imatinib-free medium (Imatinib withdrawal condition) containing CellTrace Violet probe. CellTrace Violet fluorescences have been measured by flow cytometry following 1, 2 and 3 days after Imatinib withdrawal. (C) DA1-3b cells were untreated or treated by Imatinib ($0.5\ \mu\text{M}$) for 7 days. Mitochondrial membrane potential, mitochondrial mass and mitochondrial ROS production were measured in living (yellow histograms) and dead (red histograms) cells using flow cytometry analysis of mitotracker deep red, mitotracker green and mitosox red stainings respectively, and annexin V and sytox stainings. For membrane potential analysis, FCCP was used as positive control for depolarization of mitochondrial membrane (grey histogram). The mean of fluorescence is indicated at the top right corner of each histogram. Cytofluorimetric profiles are representative of three independent experiments. (D) Using cell sorting by flow cytometry, DA1-3b cells have been separated in two subpopulations characterized by low or high mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi\text{m}$) in comparison with unsorted population. Both populations have been treated with Imatinib (at the indicated concentrations) for 7 days and the percentage of persistent cells (annexin V neg. / sytox neg) have been determined by flow cytometry.

(mean \pm SD, n = 3, * p < 0.05; *** p < 0.005). (E) Cell death (by PI staining) in DA1-3b cells treated by Kidrolase or Erwinase (from 0 to 2 UI/mL) in combination with Imatinib (0.5 μ M) was determined after 7 days (mean \pm SD, n = 3, *p < 0.05).

Figure 6 – TKI and Kidrolase combination increases chemosensitivity in different models of TKI resistance. (A) Schematic representation of tumor dormancy model set up and treatments on leukemic dormant cells d60 and d365. Previously, mice were immunized with irradiated IL12–transduced DA1-3b cells, challenged with wild-type DA1-3b cells and randomly killed after 60 days or 365 days follow-up [2,24]. Leukemic residual cells were collected from bone marrow of sacrificed mice and used to generate stable cell lines (DA1-3b/d60 or DA1-3b/d365). (B) Lethal leukemia developed in mice injected intraperitoneally with DA1-3b wt, DA1-3b/d60 or DA1-3b/d365 cells. (C-D) DA1-3b, DA1-3b/d60 and DA1-3b/d365 cells were treated by Imatinib and Kidrolase for 48 hrs and cell death was assessed using flow cytometry analysis of annexin V and PI stainings. (n=3). (E) Schematic representation of colony forming cell (CFC) assay set up (see materials and methods for more details) (upper panel). DA1-3b cells were treated *in vitro* with Imatinib 1 μ M (Ima.) and/or Kidrolase 2 UI/mL (Kidro) for 72 hrs. Cells were then seeded in semi-solid medium and left to incubate for 7 days. Images representative of 3 experiments are shown (lower panel). The clonogenic potential of leukemic cells after undergoing treatments are measured by colonies count (right panel) (mean \pm SD, n = 3, *p < 0.05). (F) Assessment of CD34⁺ progenitors from cord blood cells of 2 healthy donors (CBCs) viability (by PI assay) after 48 hrs exposure to Imatinib (3 μ M) and Kidrolase (2 UI/mL). (G) Assessment of the viability of CD34⁺/CD38⁻ primary CML cells (freshly collected from 4 newly diagnosed CML patients) after 48 hrs exposure *ex vivo* to Imatinib (3 μ M) and Kidrolase (2 UI/mL). (H) Long-Term Culture Initiating Cell assay of postculture CML progenitors were performed. CD34⁺/CD38⁻ primary leukemic cells (cryopreserved samples from 6 CML patients) were incubated in myelocult medium containing vehicle, imatinib (2 μ M), kidrolase (2 UI/ml) or imatinib and kidrolase. Then, CML cells were then plated in contact with MS5 stromal feeders for 5 weeks. The number of Imatini-resistant LTC-IC was determined by replating in methylcellulose (mean \pm SD, n = 3, *p < 0.05).

Acknowledgements

This work received financial support from INSERM, UNIVERSITE DE LILLE, Ligue contre le Cancer (to PM and JK). AT, QF and RK are recipients of CHU Lille-Univ- Région Nord-Pas de Calais fellowships.

The authors thank Nathalie Jouy and Emilie Floquet (BiCell-IFR1 14 flow cytometry platform) for her assistance with the flow cytometry analyses.

Author Contributions

AT, RK, QF, PM MJ, NG, WL, SD, BG and TI performed experiments and interpreted data. BT, DB, TI, BQ, JK and PMA designed experiments, interpreted data and wrote the manuscript. FX-M, BT and VC provided the patients samples. All authors approved the paper.

Competing Interests

All other authors declare no competing financial interests

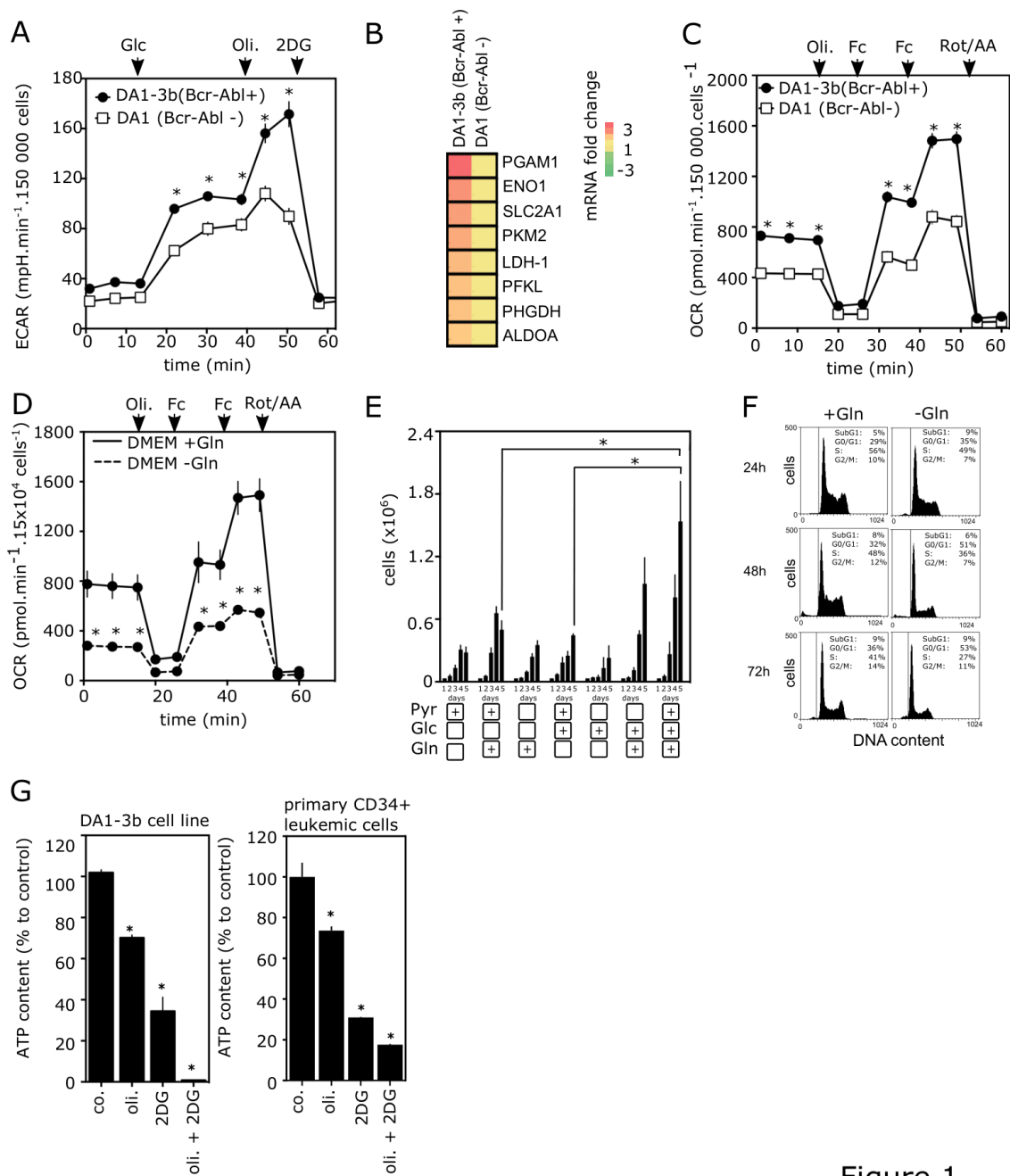


Figure 1

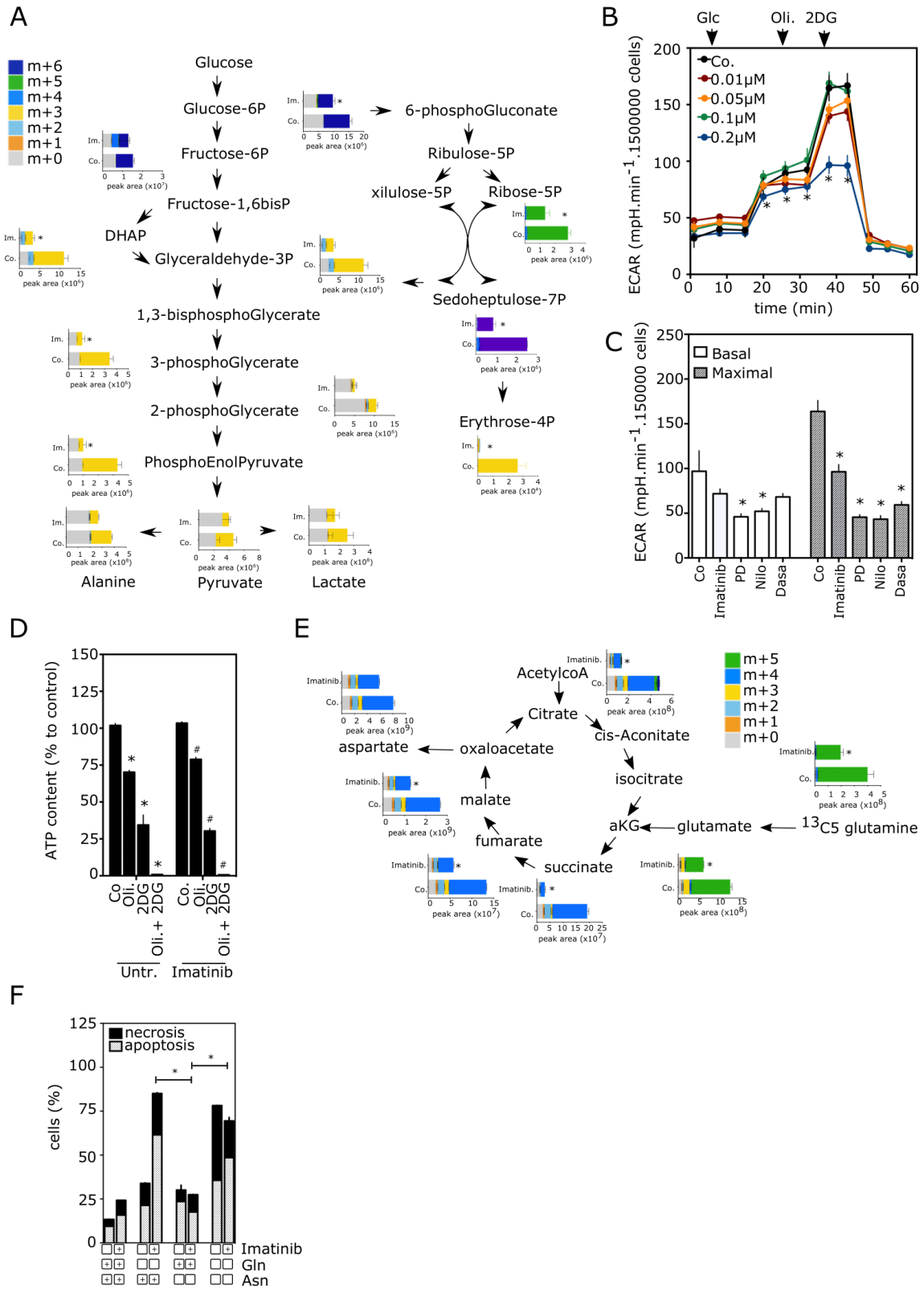


Figure 2

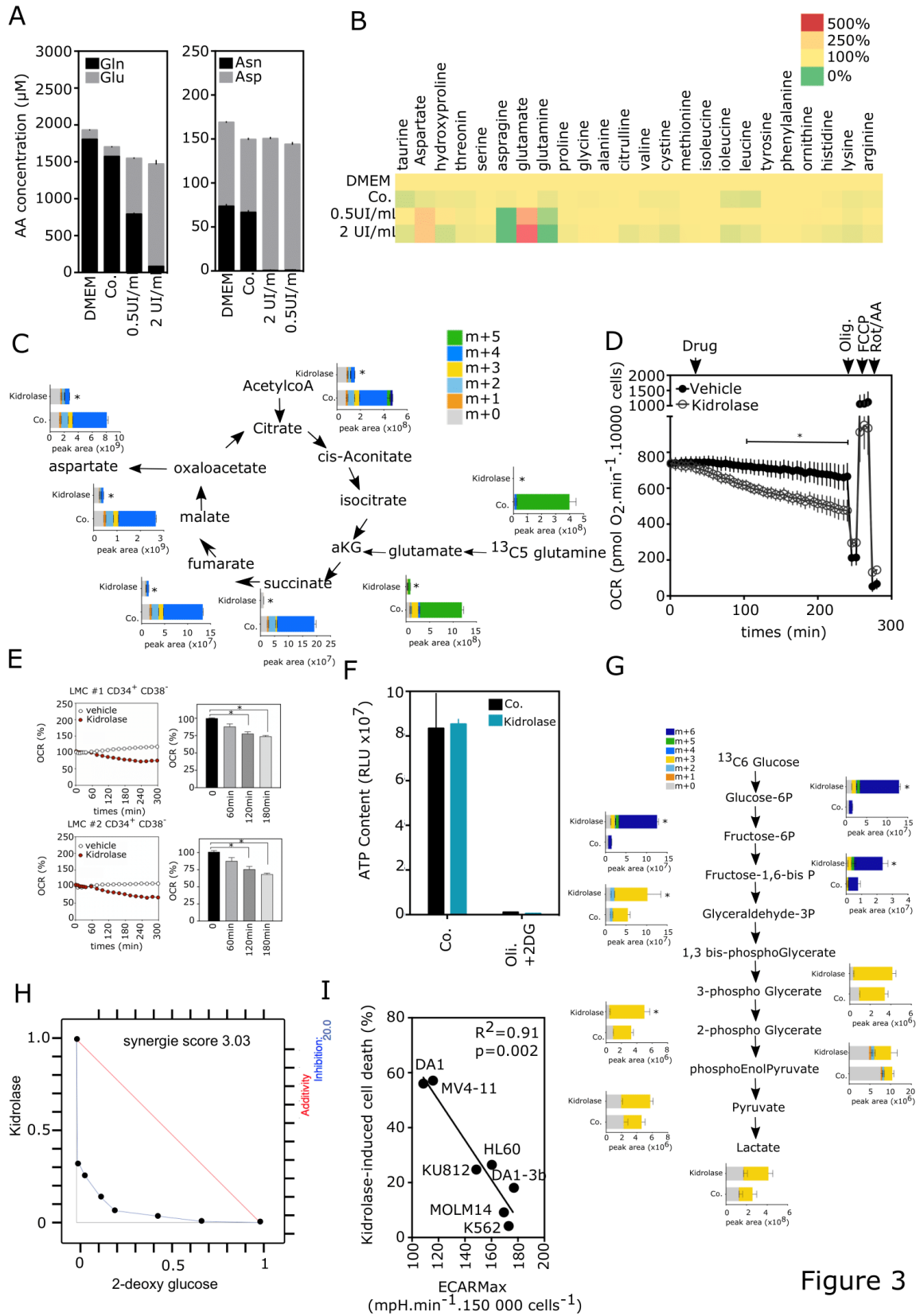


Figure 3

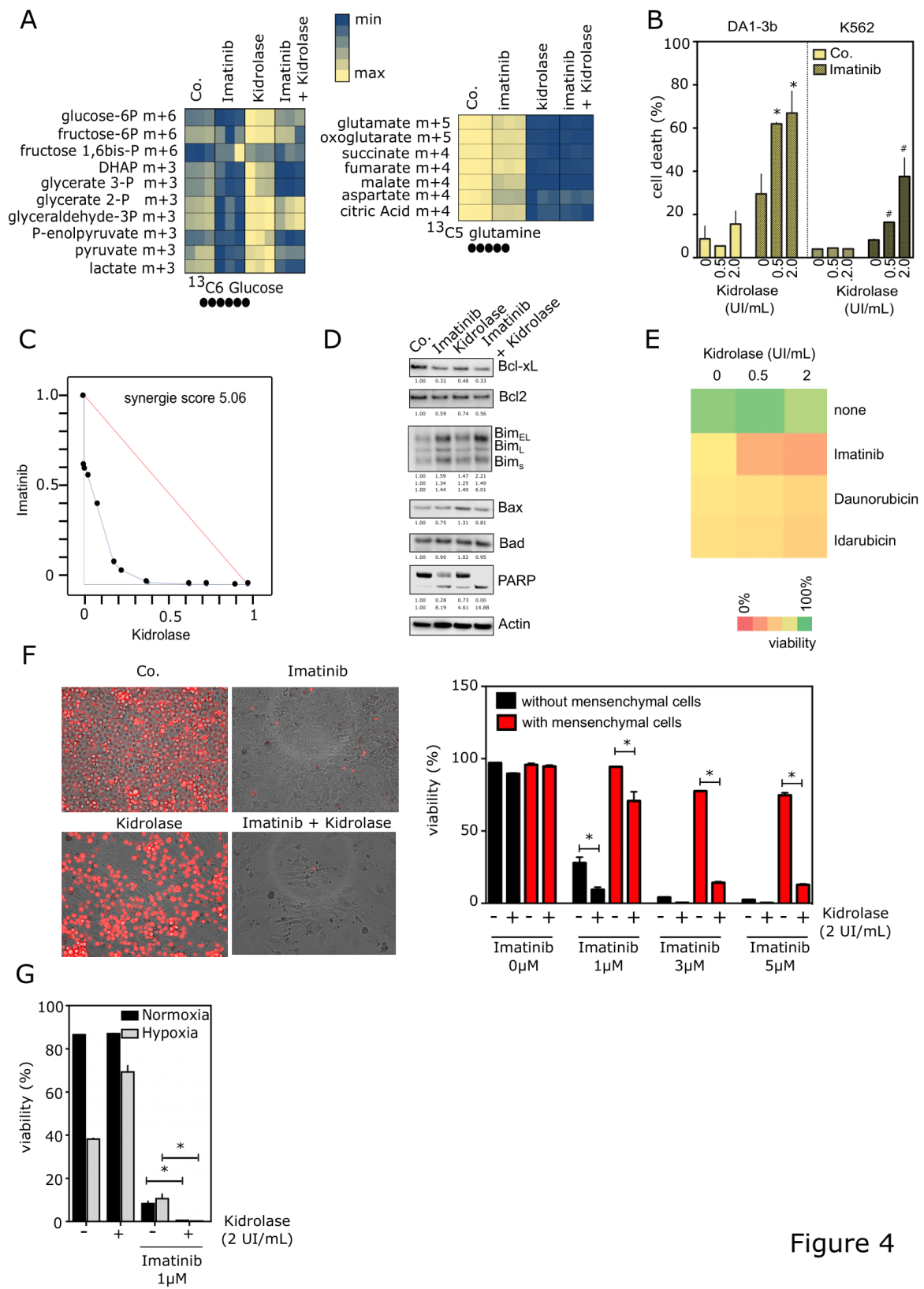


Figure 4

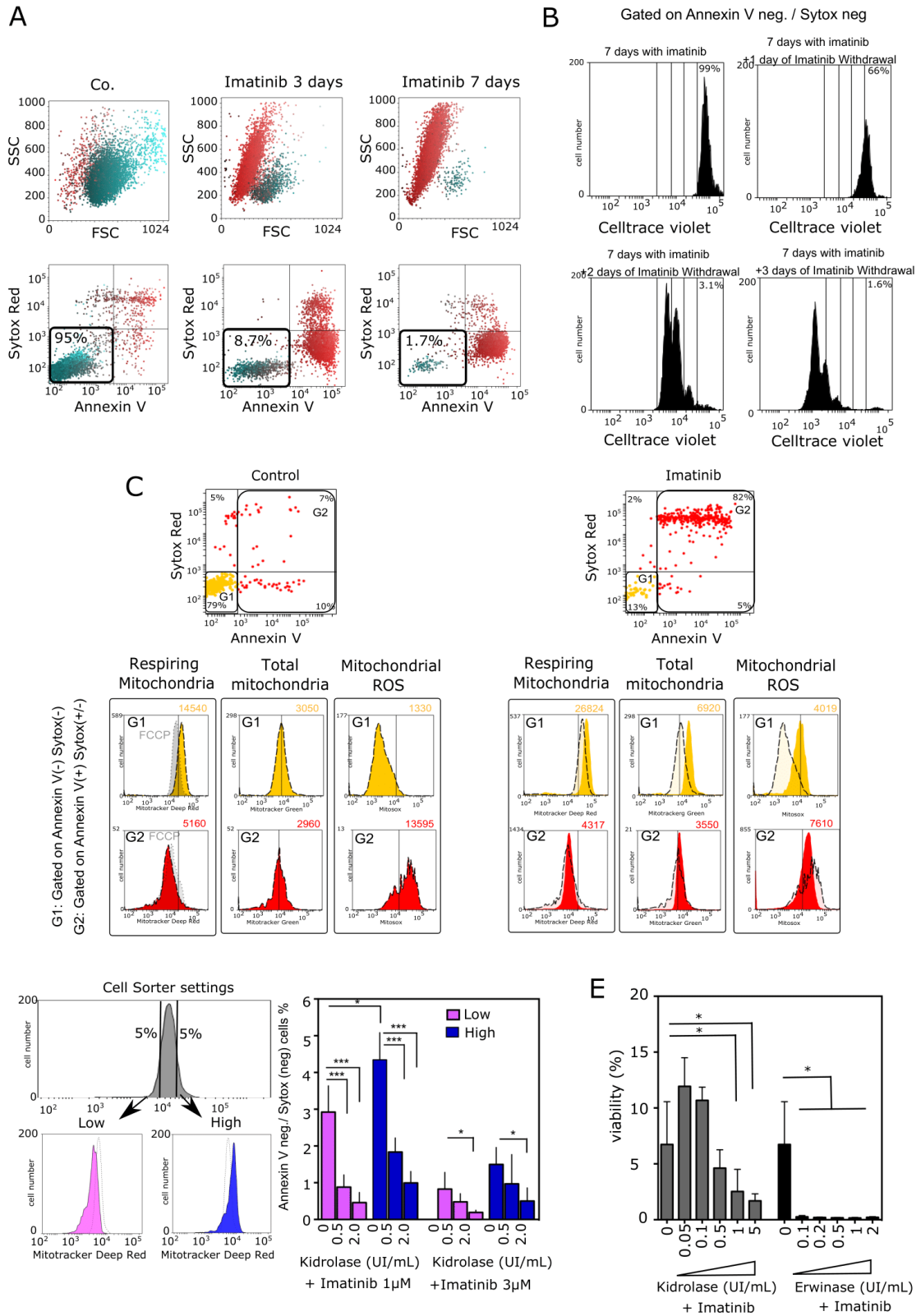


Figure 5

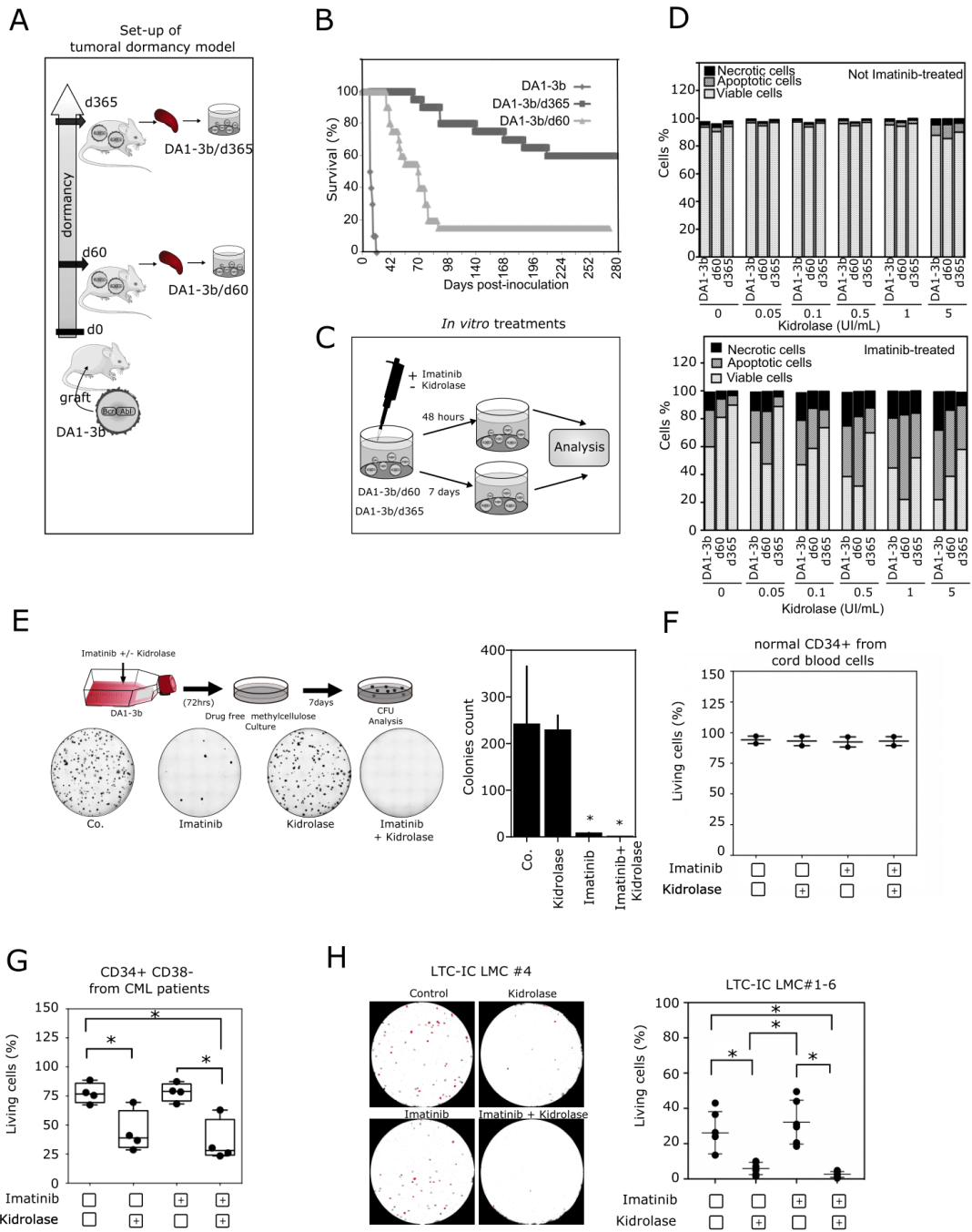


Figure 6

Supplementary materials and methods

Chemicals

Imatinib mesylate was purchased from Sigma-Aldrich, Nilotinib and Dasatinib were purchased from Selleckchem. Kidrolase and Erwinase were provided by CHU Lille, [$^{13}\text{C}_6$] Glucose and [$^{13}\text{C}_5$] Glutamine were obtained from Professor Bart Ghesquière.

Cell lines

The leukemic DA1-3b cell line was generated by stable transfection of BCR-ABL1^{14,16 14,15 15,16}. Isolation of tumor cells d60 and d365 have been described previously^{14,16 15,17 16,17}. K562, KCL-22 and KU812 cell lines were grown in the same conditions. MS-5 mesenchymal cells were grown in α -MEM medium w/o nucleosides (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum, 50 U/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine and 2 mM pyruvate. The identity of HBL, LND, and Mel-4M was also confirmed by karyotyping and array comparative genomic hybridization testing.

OCR and ECAR measurement, determination of cellular ATP

Extracellular acidification rate measurements (ECAR) and oxygen consumption rate (OCR) were measured using the Seahorse XFe24 analyzer (Seahorse Bioscience, Billerica, MA, USA). Detailed methods are provided in Supplementary Information files. Seahorse XF24 microplates were pre-coated with Corning™ Cell-Tak (Fisher Scientific). Cells were suspended in medium containing DMEM (D5030, Sigma-Aldrich) with L-glutamine (2mM) and NaCl (32 mM) for glycolysis, or L-glutamine (2mM), glucose (10 mM) and pyruvate (1 mM) for oxygen consumption, and seeded at 150 000 cells/100 μ l/well for cell lines and 250 000 cells/100 μ l/well for primary cells. Cells were left to adhere by two successive centrifugations at low speed (650 rpm, then 450 rpm), and the microplate was left to stabilize for at least 20 min at 37°C in CO₂-free incubator, after that 400 μ l of warm medium were added to each well. Measurement of ECAR was done at baseline and after injections of the following molecules: D-glucose (10 mM), oligomycin A (1 μ M), an ATP synthase inhibitor, and 2-deoxy-glucose (2-DG, 10 mM), a competitive inhibitor of glucose. For OCR measurement, the following molecules were added: oligomycin A (1 μ M), FCCP (0.25-0.5 μ M), rotenone (1 μ M) and antimycin A (1 μ M).

For cellular ATP measurement, cells were seeded at 20 000 cells/100 μ l for cell lines or 100 000 cells/100 μ l for primary cells. After indicated time of treatments, Celltiter Glow Assay kit (Promega) was used according to the manufacturer's procedures.

Cell proliferation was determined using cell counter Beckman cell counter or by cell numbers recorded after being seeded, using CyQuant direct proliferation kit from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

Cytofluorometric analysis

Evaluation of cell viability was performed by determining the percentage of sub-G1 cells with propidium iodide staining (50 µg per ml, 30 min, 4°C) (P4864, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) or by annexin V-FITC (0.45 µg per sample, 10 min, RT) (Biolegend), annexin V-APC (0.45 µg per sample, 10 min) (Biolegend), sytox blue (1µM, 10 min, RT) (Thermo Fisher Scientific), sytox red (5 nM, 10 min, RT) (Thermo Fisher Scientific), Cell trace violet (1µM, 15min, RT) (Thermo Fischer Scientific).

The CD34/CD38 cell profile was analyzed in one single tube containing the following molecules: for human cells CD34 ECD (clone 581, Beckman Coulter), CD38 APC (clone HIT2, Biolegend), CD45 BUV395 (clone HI30, BD Biosciences), for murin cells CD34 PE (clone MEC14.7, Biolegend), CD38 APC (clone 90, Biolegend), CD45.2 Brilliant violet 421 (clone 104, Biolegend) or a control isotype antibody.

Mitochondrial content, mitochondrial membrane potential and mitochondrial ROS production were assessed by MitoTracker Green (125 nM, 30 min, 37°C) (Thermo Fisher Scientific), MitoTracker Deep Red (125 nM, 30 min, 37°C) (Thermo Fisher Scientific) and Mitosox (2.5 µM, 30 min, 37°C) (Thermo Fisher Scientific) stainings respectively.

Fluorescence levels following cellular staining were analyzed by FACS LSR Fortessa X20 (Becton Dickinson).

Immunoblot analysis and Real-time quantitative reverse transcription

For immunoblot, cell lysates were prepared as described previously^{14,17} Quantitative detection of mRNA was performed by real-time PCR using the Lightcycler 480 detector (Roche Applied Science, Mannheim Germany) as previously published^{15,17}.

Amino acid measurements

Amino acids concentration assay (µmol/l) was performed by high-performance liquid chromatography (Shimadzu C18 column, Kyoto, Japan) associated with tandem mass spectrometry (Sciex 3200 Qtrap, Framingham, MA) using the aTRAQ kit for amino acid analysis of physio-logical fluids (Sciex). Acquisition in the mass spectrometer was achieved by multiple reaction monitoring. Data recording and analysis were performed with Analyst software, v.1.6 (Sciex). Internal controls were systematically analyzed for each series of samples.

Glucose and lactate measurements

Glucose and lactate were measured in the extracellular medium using a SYNCHRON LX20 Clinical system (Beckman Coulter, Fullerton, CA USA).

Metabolite flux

Two hundred thousand cells were supplemented with media containing uniformly labelled U -¹³C₆ glucose (25 mM) or ¹³C-glutamine (2 mM) for 24 hrs. Cells were rinsed with ice-cold 0.9% NaCl solution and metabolites were extracted by adding 250 µl of a 50/30/20 solution (methanol-acetonitrile 10 mM Tris-HCl pH 9.4) to the cells. Plates were then incubated for 3 min on ice. Cells were transferred to an eppendorf tube before centrifugation at 20 000g for 10 min at 4°C. Supernatants were then transferred to a fresh tube and stored at -80°C, and pellets were used for BCA/protein assay to normalize each condition to the same cell number. Separation of metabolites prior to Mass Spectrometry (MS) measurement was performed using a Dionex UltiMate 3000 LC System (Thermo Scientific) coupled to a Q Exactive Orbitrap mass spectrometer (Thermo Scientific) operating in negative ion mode. Practically, 15 µl of the cellular extract was injected on a C18 column (Aquility UPLC®HSS T3 1.8µm 2.1x100mm) and the following gradient was performed by solvent A (H₂O, 10mM Tributyl-Amine, 15mM acetic acid) and solvent B (100% Methanol). Chromatographic separation was achieved with a flowrate of 0.250ml/min and the following gradient elution profile: 0min, 0%B; 2min, 0%B; 7min, 37%B; 14min, 41%B; 26min, 100%B; 30min, 100%B; 31min, 0%B; 40min, 0%B. The column was placed at 40°C throughout the analysis. The MS operated both in full scan mode (m/z range: 70-1050) using a spray voltage of 4.9 kV, capillary temperature of 320°C, sheath gas at 50.0, auxiliary gas at 10.0. The AGC target was set at 3e6 using a resolution of 140 000, with a maximum IT fill time of 512 ms. Data collection was performed using the Xcalibur software (Thermo Scientific).

LTC-IC assays

CD34+ CD38⁻ from 6 CML patients (400 cells) were drug-treated and resuspended in Myelocult (H5100 – Stemcell) supplemented with hydrocortisone (10⁻⁶ M) seeded (35-mm dish) onto a feeder layer MS5 murine stromal cells and incubated for 5 weeks. Half medium was replaced weekly. After 5 weeks, cells were recovered, counted and replated (75000 cells in 35-mm dish) in Methocult (H4435 – Stemcell). Colonies were scored after two weeks of incubation.

Supplementary Legends

Supplementary Figure 1. (A) Cell proliferation in DA1-3b cells treated with Imatinib (from 0 to 1µM) was determined at 24, 48, 72, 96 hrs (mean ± SD, n = 3, *p < 0.05). (B) Cell death in DA1-3b cells treated with Imatinib (at the indicated concentrations) was determined by cytometric analysis following Annexin V and Sytox blue staining at 48 hrs (mean ± SD, n = 3, *p < 0.05). (C) Immunoblotting of STAT5a/b, STAT3 and Akt phosphorylation (as indicated) in DA1-3b cells treated with Imatinib (0.2 µM for 24 hrs). Actin is used as loading control. Pictures are representative of three

independent experiments. (D) Assessment of mitochondrial membrane potential in DA1-3b cells treated with Imatinib at the indicated concentration for 24 hrs. The percentage of low $\Delta\psi_m$ cells was determined by flow cytometry using mitotracker deep red probes and are indicated in the top left corner of each histogram. (E) Assessment of mitochondrial ROS production in DA1-3b cells treated with Imatinib at the indicated concentration for 24 hrs. The percentage of cells with high level of ROS was determined by flow cytometry using mitosox probes and are indicated in the top right corner of each histogram.

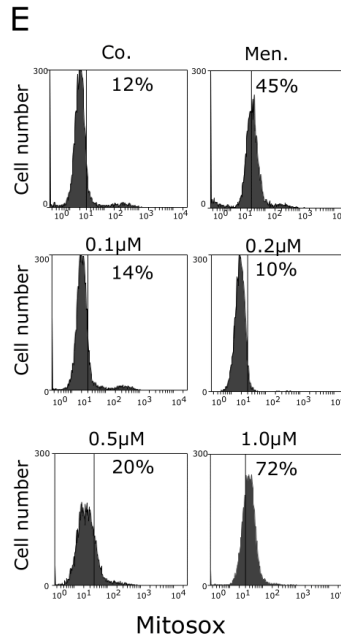
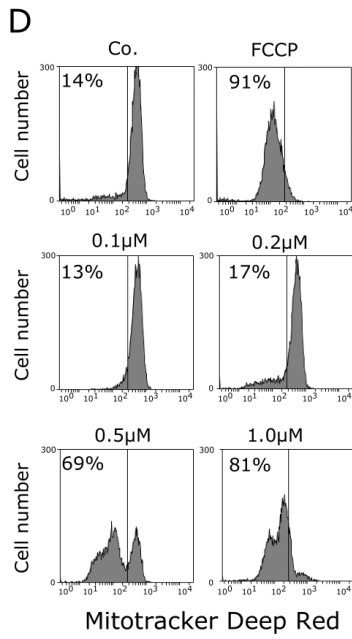
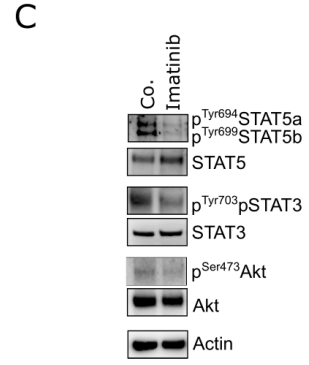
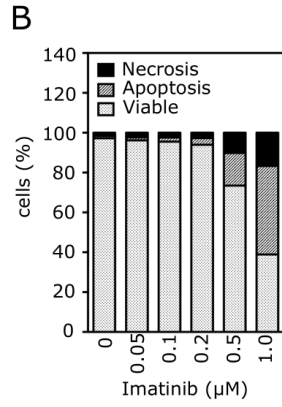
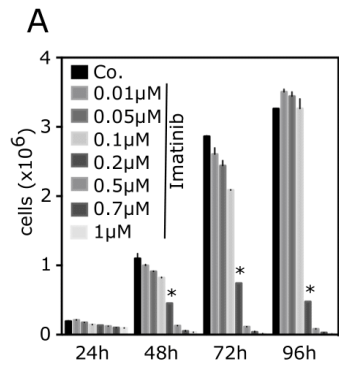
Supplementary Figure 2. (A) and (B) Glucose and lactate concentrations were determined after 24, 48 and 72 hrs of treatment of Imatinib (0.01-1 μ M) in DA1-3b cells. (C) Immunoblotting of glucose transporter GLUT1 and GLUT6, Hexokinase 2 (HK2), Aldolase B (AldoB), Phosphoglycerate mutase (PGAM), Phosphoglycerate kinase (PGK), Enolase, Pyruvate kinase M2 (PKM2) in DA1-3b cells treated with Imatinib (0 - 0.2 μ M) for 24 hrs. Actin was used as loading control. Pictures are representative of three independent experiments. (D) Leukemic cells were treated with sub-lethal concentration of BCR-ABL1 TKI (Imatinib 0.2 μ M, PD180970 0.01 μ M, Nilotinib 5 nM, Dasatinib 2 nM) for 24 hrs, and basal OCR were assessed (mean \pm -SD, n=3. * P < 0.05 compared to control condition). (E) DA1-3b leukemic cells were treated with Imatinib (0.01-0.2 μ M) for 24 hrs or with Oligomycin A (1 μ M) or/and 2-DG (10mM) for 4 hrs. ATP levels were then measured by luminescence (mean \pm -SD, n=3. * P < 0.05).

Supplementary Figure 3. (A) DA1-3b cells were cultured in medium containing Kidrolase (at the indicated concentrations) for 4 hrs. Cells were centrifugated, supernatant was removed and Glutamine concentration was measured by HPLC/MS. Results are expressed as percentage of untreated condition. (B) Cell cycle analysis by flow cytometry of DA1-3b cells treated with Kidrolase for 48 hrs at the indicated concentrations. Pictures are representative of three independent experiments. (C) Cell death in 8 leukemia cell lines treated with kidrolase (at the indicated concentrations) was determined by cytometric analysis following PI staining at 48 hrs (n = 3). (D) DA1-3b cells were cultured with combination of 2-DG (0, 0.5 and 1mM) and Kidrolase (0, 0.5 and 2 UI/mL) for 48 hrs and sub-G1 cells have been quantified by flow cytometry using propidium iodide probe (n=3). (E) Immunoblotting of mitochondrial respiratory chain complex proteins such as complex I (20 kDa subunit), complex II (SDHB), III (core 2 protein), IV (Cox II) and V (F1a ATPase) in DA1-3b cells treated with Imatinib (0.2 μ M) and/ or kidrolase (0.5 UI/mL). Actin is used as loading control. Pictures are representative of three independent experiments. (F) DA1-3b cells were cultured with combination of kidrolase (2 UI/mL) and imatinib (0.5 μ M) for 24 hrs and subG1 cells have been quantified by flow cytometry using propidium iodide probe. Histograms are representative of three independent experiments. (G) Cell proliferation and cell death (by PI staining) in DA1-3b cells treated by Kidrolase (from 0 to 2 UI/mL) were determined at 24, 48 and 72 hrs (mean \pm SD, n = 3, * or # p < 0.05 respectively compared to control).

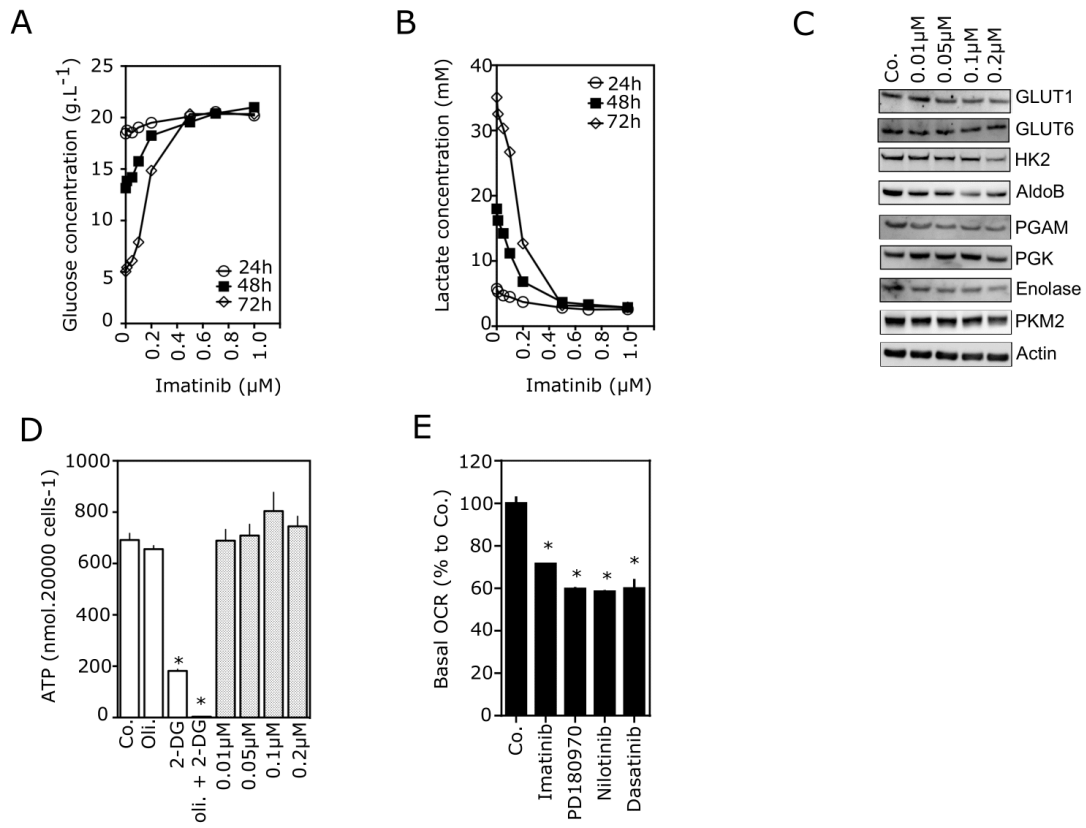
Supplementary Figure 4. Assessment of the viability of CD34+/CD38+ primary CML cells (freshly collected from 4 newly diagnosed patients) after 48 hrs exposure *ex vivo* to Imatinib (3 μ M) and Kidrolase (2 UI/mL).

Supplementary Figure 5. Assessment of the viability of CD34+/CD38- primary leukemic cells (cryopreserved samples from 6 CML patients) after 48 hrs exposure *ex vivo* to Imatinib (3 μ M) and Kidrolase (2 UI/mL).

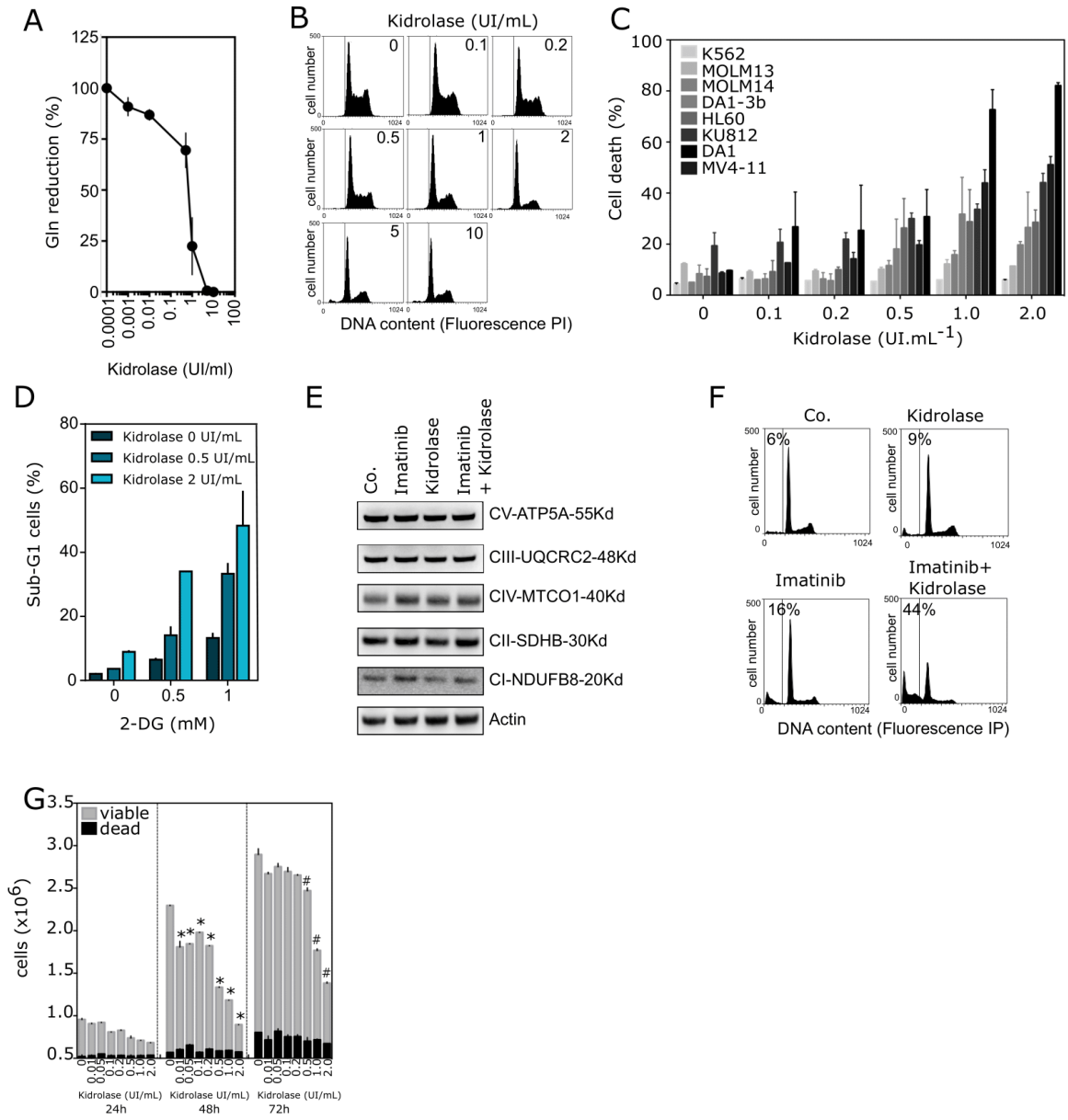
Supplementary Figure 6. Long-Term Culture Initiating Cell assay of postculture CML progenitors were performed. CD34+/CD38- primary leukemic cells (cryopreserved samples from 5 CML patients) were incubated in myelocult medium containing vehicle, imatinib (2 μ M), Kidrolase (2 UI/ml) or imatinib and kidrolase. Then, CML cells were then plated in contact with MS5 stromal feeders for 5 weeks.



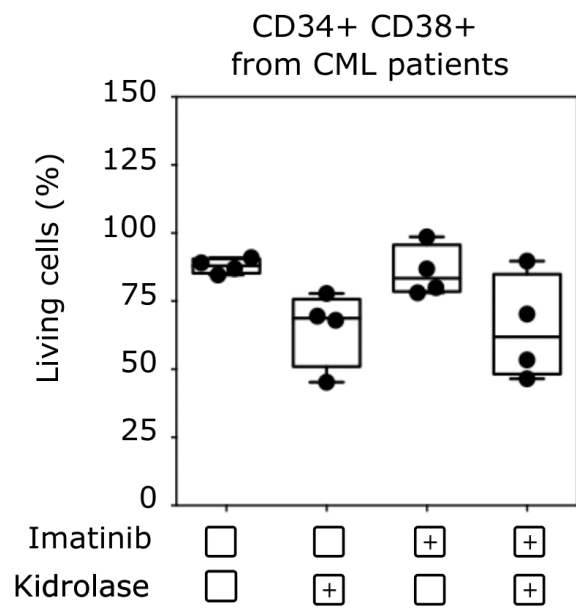
Supplementary Figure 1



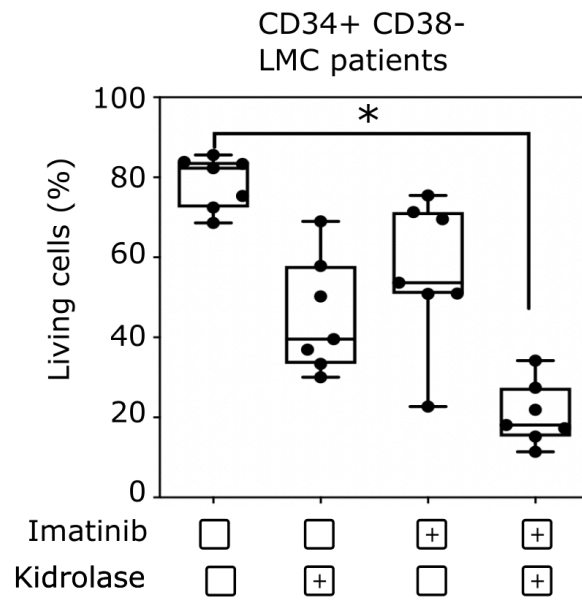
Supplementary Figure 2



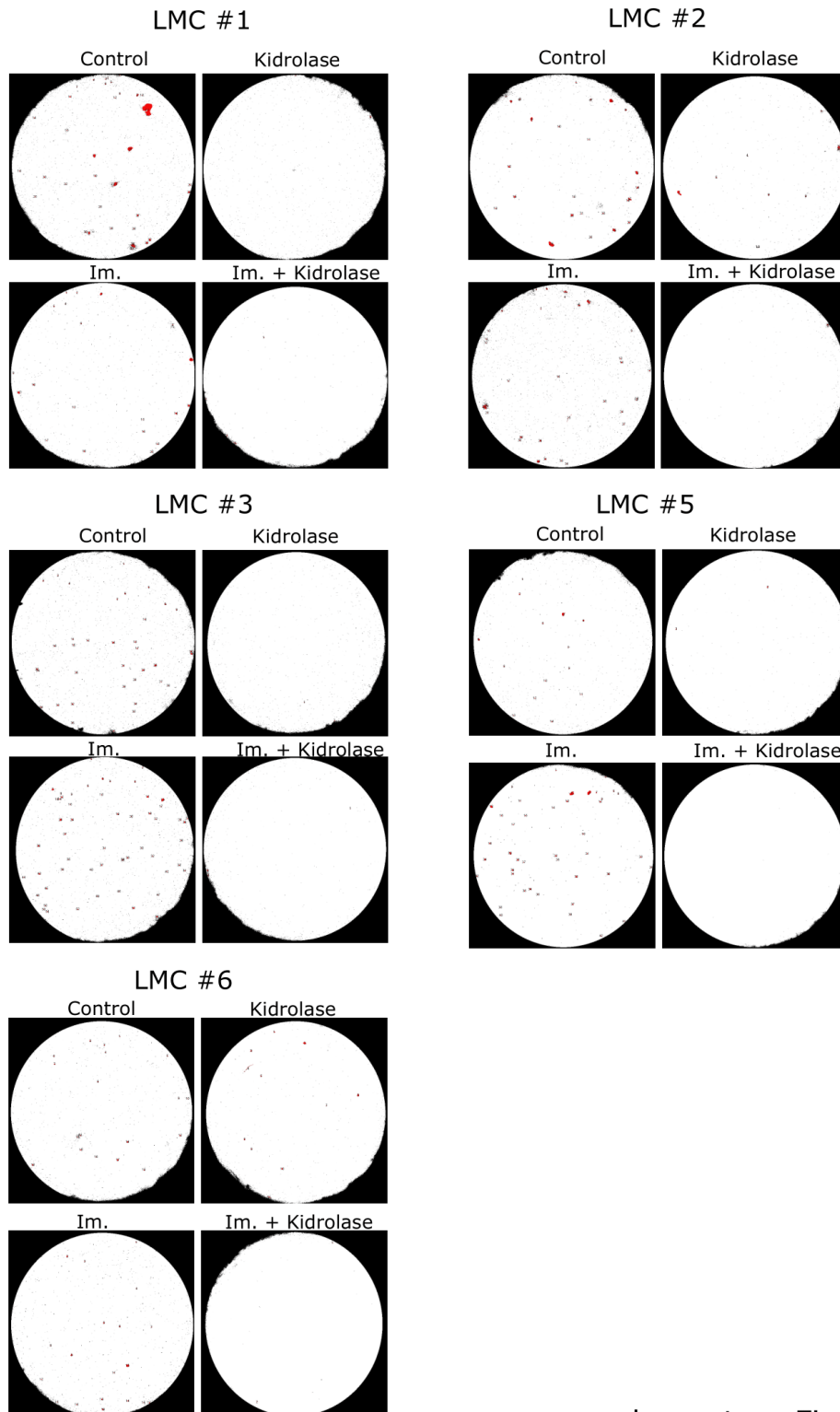
supplementary Figure 3



supplementary Figure 4



supplementary Figure 5



supplementary Figure 6

