Université de Lille Faculté de Pharmacie de Lille
Année Universitaire 2021/2022

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenue publiquement le 27 octobre 2022
Par Mme DEGAND Claire

Les différentes méthodes de mesure du métabolisme énergétique mitochondrial des Leucémies Aiguës Myéloïdes pour établir un biomarqueur de la réponse aux traitements

---

Membres du jury :

Président :	**Professeur Delphine ALLORGE**, Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie, Lille, UFR3S, Praticien Hospitalier, CHRU, Lille
Directeur, conseiller de thèse :	**Professeur Guillaume GARÇON,** Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie, Lille, UFR3S.
Assesseur(s) :	**Professeur Thierry BROUSSEAU,** Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie, Lille, UFR3S, Praticien Hospitalier, CHRU, Lille.
	Professeur Anne MUHR-TAILLEUX, Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie, Lille, UFR3S.
	Professeur Jérôme KLUZA, Professeur des Universités, Faculté de Médecine, Lille, UFR3S.

Faculté de Pharmacie de Lille
3 Rue du Professeur Laguesse – 59000 Lille
03 20 96 40 40
https://pharmacie.univ-lille.fr

Université de Lille

Président	Régis BORDET
Premier Vice-président	Etienne PEYRAT
Vice-présidente Formation	Christel BEAUCOURT
Vice-président Recherche	Olivier COLOT
Vice-présidente Réseaux internationaux et européens	Kathleen O'CONNOR
Vice-président Ressources humaines	Jérôme FONCEL
Directrice Générale des Services	Marie-Dominique SAVINA

UFR3S

Doyen	Dominique LACROIX
Premier Vice-Doyen	Guillaume PENEL
Vice-Doyen Recherche	Éric BOULANGER
Vice-Doyen Finances et Patrimoine	Damien CUNY
Vice-Doyen Coordination pluriprofessionnelle et Formations sanitaires	Sébastien D'HARANCY
Vice-Doyen RH, SI et Qualité	Hervé HUBERT
Vice-Doyenne Formation tout au long de la vie	Caroline LANIER
Vice-Doyen Territoires-Partenariats	Thomas MORGENROTH
Vice-Doyenne Vie de Campus	Claire PINÇON
Vice-Doyen International et Communication	Vincent SOBANSKI
Vice-Doyen étudiant	Dorian QUINZAIN

Faculté de Pharmacie

Doyen	Delphine ALLORGE
Premier Assesseur et Assesseur en charge des études	Benjamin BERTIN
Assesseur aux Ressources et Personnels	Stéphanie DELBAERE
Assesseur à la Santé et à l'Accompagnement	Anne GARAT
Assesseur à la Vie de la Faculté	Emmanuelle LIPKA
Responsable des Services	Cyrille PORTA
Représentant étudiant	Honoré GUISE

Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers (PU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique	81
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie	82
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie	82
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie	82
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie	82
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire	82

Professeurs des Universités (PU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique - RMN	85
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie	87
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	COURTECUISSE	Régis	Sciences végétales et fongiques	87
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques	87
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique - RMN	85
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie thérapeutique	86
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie bioinorganique	85

M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques	87
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie	86
M.	ELATI	Mohamed	Biomathématiques	27
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie	87
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique	85
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique	86
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique	85
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie	86
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique	86
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques	26
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire	87
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire	87
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie physique	85
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie	87
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie	87
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie	86
M.	SERGHERAERT	Éric	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique	86

Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers (MCU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	BLONDIAUX	Nicolas	Bactériologie - Virologie	82
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie	82
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81

M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie	82

Maîtres de Conférences des Universités (MCU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique	85
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie	87
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire	87
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	85
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie	87
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique - RMN	85
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie	87
M.	BOCHU	Christophe	Biophysique - RMN	85
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie	86
M.	BOSC	Damien	Chimie thérapeutique	86
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie	87
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire	87
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	CHARTON	Julie	Chimie organique	86
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique	85
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques	85
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques	27
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire	87

M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique	86
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	FLIPO	Marion	Chimie organique	86
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie	87
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie	87
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques	26
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie	86
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie	87
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie	87
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique	85
Mme	LEHMANN	Hélène	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique	85
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques	26
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie	86
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences végétales et fongiques	87
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques	85
M.	PIVA	Frank	Biochimie	85

Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique	86
M.	POURCET	Benoît	Biochimie	87
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / Innovations pédagogiques	85
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique	86
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie	86
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie	86
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie	87
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie	87
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie	87
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Chimie organique	86
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques	87
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique	86
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques	85

Professeurs certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeurs Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Chimie thérapeutique	86
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie pharmaceutique	86

Maîtres de Conférences Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques	85
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques	85

M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	85
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	MITOUMBA	Fabrice	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	86
M.	PELLETIER	Franck	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques	85

Assistants Hospitalo-Universitaire (AHU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie	82
Mme	LENSKI	Marie	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	GEORGE	Fanny	Bactériologie - Virologie / Immunologie	87
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	RUEZ	Richard	Hématologie	87
M.	SAIED	Tarak	Biophysique - RMN	85
M.	SIEROCKI	Pierre	Chimie bioinorganique	85

Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière

Faculté de Pharmacie de Lille

3 Rue du Professeur Laguesse – 59000 Lille
03 20 96 40 40
https://pharmacie.univ-lille.fr

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

“It is not the strongest of the species that survive, nor the most intelligent, but the one most responsive *(metabolically)* to change” - Darwin

À ma maman,
À Jean-Luc,
À mes frère et sœurs,
À Léa,

Remerciements

Aux membres du jury,

Madame le Doyen Delphine Allorge,

Je suis honorée que vous ayez accepté de présider ce jury de thèse et je tiens à vous en remercier. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Jérome Kluza,

Je vous remercie aujourd'hui pour m'avoir accordé votre confiance lors de notre première rencontre. Merci de me partager au quotidien votre expérience avec passion afin de me faire progresser. Le début de cette longue expérience à vos côtés est déjà tellement enrichissant. Merci pour vos conseils et votre bienveillance tout au long de la rédaction de cette thèse.. J'espère que mon investissement est à la hauteur de vos attentes et de l'ambition que vous portez à ces recherches.

Monsieur le Professeur Guillaume Garçon

Je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude pour avoir accepté de diriger cette thèse. Merci pour vos précieux conseils qui n'ont fait qu'enrichir ce travail. Je vous suis très reconnaissante de l'intérêt que vous avez bien voulu témoigner à ce sujet et j'espère que vous l'apprécierez.

Monsieur le Professeur Thierry Brousseau

Je tiens à vous remercier pour avoir d'accepter de juger cette thèse. J'espère de tout cœur que vous apprécierez son contenu.

Madame le Professeur Anne Muhr-Tailleux

Je tiens à vous remercier d'avoir accepté de juger mon travail de thèse et de faire partie de ce jury. Soyez assurée, Madame, de toute ma reconnaissance et de tout mon respect.

Aux membres de l'Unité,

Professeur Bruno Quesnel

Votre accueil au sein de l'équipe Facteurs de persistance des cellules leucémiques est pour moi un honneur.

William, merci pour ton encadrement, ton soutien, ta gentillesse et tes conseils avisés. Tu es toujours prêt à échanger, partager, discuter dans la bonne humeur**.** Merci de partager sans réserve ta vision des choses et d'être toujours de bons conseils.

Salim, en premier lieu Merci d'avoir été le sauveteur de cette thèse. Promis pour la thèse de recherche je ferai beaucoup plus de sauvegarde ! Merci de m'apporter ton aide au quotidien ainsi que ta bonne humeur. Ton humour inégalable est pour moi un réconfort.

Nico, merci pour toute la bonne humeur que tu véhicules au sein du laboratoire.

Mélanie, merci pour ta disponibilité et ton extrême gentillesse.

Julie, malgré les débuts où tu voulais me pousser dans les escaliers, tu es maintenant d'un soutien sans faille pour moi. Nous voilà presque à mi-chemin d'une belle aventure que nous traversons ensemble, et je suis très heureuse de la partager avec toi. Après avoir trouvé une collègue, j'ai maintenant trouvé une amie. Nos conversations dans le bureau ou au barillet sont de vrais petits moments de bonheurs.

Nathalie & Emilie, merci pour vos nombreux conseils et votre aide qui sont pour moi très précieux.

Quentin, merci de m'avoir transmis le flambeau. Tu as été mon exemple, j'espère que tu seras fier du travail que je présente ici. Merci pour tes conseils avisés tout au long de ce parcours semé d'embuches.

Les autres, aux personnes que je n'ai pas forcément mentionné, mais qui participent à rendre mes journées à l'IRCL aussi agréables..

À mes proches,

À ma petite Maman, c'est avant tout grâce à toi que je suis ici aujourd'hui. Même si de simples mots ne pourront jamais traduire toute la reconnaissance que je te porte, pour le soutien sans faille que tu m'as témoigné tout au long de ces études, je profite de ces quelques lignes pour te remercier de m'avoir inculqué les valeurs de travail, de mérite, mais également d'amour et de soutien. Tout simplement merci ma petite maman, pour donner autant de ta personne à chacun de tes enfants. Je t'aime très fort ma mamounette !

À mes sœurs et mon frère, pour tous les moments que l'on partage ensemble qui font de moi une petite sœur comblée. **Charlotte**, merci d'être une grande sœur aimante qui veille sur nous. **Laura**, merci de m'avoir appris que la confiance en soi résidait dans la volonté et le travail, mais aussi parce que tu nous n'as eu de cesse de nous répéter de croire en nos idées et de les assumer. **Antoine**, l'homme de la fratrie ! Merci d'être un grand frère sur qui on peut compter, toujours prêt à m'apporter ton aide à n'importe quel moment (tout comme tu es d'ailleurs prêt à aller boire une bière… à n'importe quel moment de la journée) !! **À vous tous**, n'ayant plus forcément l'occasion de le dire au quotidien, je veux vous dire Merci. Je n'oublie pas les « +1 » avec qui de réels liens, de partage et d'amitié, se sont tissés. Merci pour tous ces bons moments.

À Jean-Luc, depuis maintenant bien longtemps, tu es entré dans nos vies. Depuis ce jour-là, ta bienveillance et ta gentillesse n'ont eu de cesse de m'accompagner, de me pousser, de me porter. Merci pour ton soutien indéfectible, permanent et littéralement impossible à décourager. Tu as été pour moi un vrai pilier dans la rédaction de cette thèse. Sans la moindre hésitation, c'est toi que je sollicite aujourd'hui face à chaque doute, chaque angoisse et chaque difficulté, alors Merci d'avoir pris cette place dans nos vies, et de me traiter depuis toujours, comme ta fille.

À Mo, celui qui était présent, à chaque minute passée à travailler à mon bureau, mais également à chacune des pauses que je m'accordais en levant la tête pour un bref et fugace instant de répit (amplement mérité) je veux te dire : je t'aime & Merci !

À la Pechomoule, pour votre présence dans les bons comme dans les mauvais moments, pour votre soutien et votre amitié inconditionnelle. C'est une vraie chance de vous avoir à mes côtés depuis toutes ces années et c'est même l'une de mes plus grandes fiertés. Merci pour tous ces

moments de rires aux éclats qui sont pour moi de vraies bouffées d'oxygène. Malgré la distance géographique qui nous sépare depuis maintenant 2 ans, vous restez les meilleurs à mes yeux !

Louise, avoir démarré mes études à tes côtés à a été une vraie chance ! Nous avons passé de si bons moments ensemble qui resteront gravés dans ma mémoire ! Je n'oublierai jamais mon professeur de soutien pour ma carrière de droit qui fut si courte….

Claude, merci pour tous les moments inoubliables passés ensemble. Ton calme et ta détermination sont exemplaires ! Sache que tu pourras toujours compter sur moi !

Léa, par où commencer… « Je te souhaite de trouver ce que tu ne cherchais pas », cette phrase de nos débuts raisonne toujours en moi parce que je ne te cherchais vraiment pas. Je ne savais même pas que c'était possible de trouver cela, cette relation de meilleures amies, de deux enfants éperdument heureux qui s'amusent comme des fous mais surtout une relation d'amour comme celle-ci. Je ne pensais pas trouver quelque chose et pourtant je t'ai trouvé toi et je n'aurais pas pu rêver mieux. Alors merci de me supporter chaque jour, de relever chaque défi à mes côtés, d'affronter la thèse ensemble. Hâte de voir où ça va nous mener mais encore plus de voir qui chopera l'accent canadien en premier.

Abréviations

2
2-HG : 2-hydroxyglutarate
2DG : 2-Désoxy-d-Glucose

A
AA : Antimycine A
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNmt : ADN mitochondrial
ADP : Adénosine diphosphate
Ag : Argent
AgCl : chlorure d'argent
AMM : Autorisation de mise sur le marché
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
APAF1 : Facteur activateur des protéases apoptotiques
Ara-C : Cytarabine
ARN : Acide ribonucléique
ARNt : ARN de transfert
ASNase : L-Asparaginase
Asp : Acide Aspartique
ASXL1 : Additional Sex Combs Like 1
ATRA : acide rétinoïque all-trans
ATP : Adénosine triphosphate
ATU : Autorisation temporaire d'utilisation
ATUn : Autorisation temporaire d'utilisation nominative

B
Bcl-2 : B-cell leukemia 2

C
C^{12} : Carbone 12
C^{13} : Carbone 13
CCCP : Carbonylcyanure m-chlorophénylhydrazone
CE : Communauté européenne
CEBPA : CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha
CFU-GEMM : Colony Forming Unit-Granulocyte, Erythroblast, Megakaryocyte, Monocyte
CFU-GM : Colony Forming Unit-Granulocyte, Monocyte
Cl^- : Chlore
CLP : progéniteurs communs lymphoïdes
CIVD : Coagulation intravasculaire disséminée
CMF : Cytométrie en flux
CMP : progéniteurs communs myéloïdes
CMV : Cytomégalovirus
CO_2 : Dioxyde de carbone
CoASH : Coenzyme A
CRC : capacité de rétention calcique
CS : Cellule souche
CSH : Cellule souche hématopoïétique
CSL : Cellule souche leucémique
CytC : Cytochrome C

D
D-2HG : D-2-Hydroxyglutarate
DCF : 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine
DCPIP : Dichlorophénolindophénol
Del : Délétion
DFG : Asp – Phe - Gly
DHE : dihydroethidium
DiOC2(3) : 3,3'-Diethyloxacarbocyanine Iodide
DiOC6(3) : 3,3'-Dihexyloxacarbocyanine Iodide
DNMT3A : DNA méthyltransférase 3 alpha
DTNB : 5,5' DiThiobis-2-NitroBenzoic acid
DO : Densité Optique

E
e^- : Électron
EBV : Virus d'Epstein-Barr
ECOG : *Eastern Cooperative Oncology Group*
EFS : survie sans événement
EGIL : European Group for the Immunological Characterization of Leukemias
EIM : Espace intermembranaire mitochondrial
ELN : *European Leukemia Net*
Em : Émission
EMA : agence européenne des médicaments
ERO : Espèces réactives de l'oxygène
Ex : Excitation

F
FAB : French-American-British
FAD : Flavine adenine dinucléotide
FCCP : Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone
FDA : Food and Drug Administration
FISH : Fluorescence in situ hybridization
FMN : Flavine mononucléotide
FLT3 : Fms-related tyrosine kinase 3

G
G : Giga
G6P : Glucose 6-phosphate
G6PD : Glucose 6-phosphate déshydrogénase
G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor
Gln : Glutamine
GLS : Glutaminase
GLUT : Glucose transporter
Gly : Glycine
GSEA : Gene SET Enrichment Analysis
GTP : Guanosine triphosphate

GvHD : Graft versus Host disease
GvL : Graft versus leukemia

H
H^+ : Proton
H_2DCFDA : Diacétate de dichlorodihydrofluorescéine
H_2O : Eau
H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène
HAS : Haute autorité de santé
HDCA : Histone désacétylase
HIF1 alpha : facteur 1 alpha
HK-2 : Hexokinase-2
HLA : Antigène leucocytaire humain

I
IDH1/2/3 : Isocitrate déshydrogénase 1/2/3
Inv : Inversion
IL : Interleukines
ITD : Internal Tandem Duplications
ITK : Inhibiteur de tyrosine kinase
IV : Intraveineuse
IRA : Insuffisance rénale aiguë

J
JAK2 : Janus kinase 2

K
KCl : Chlorure de potassium
KIT : Tyrosine-protein kinase Kit ou CD117

L
L : Litre
LA : Leucémie aigüe
LAL : Leucémie aigüe lymphoïde
LAM : Leucémie aigüe myéloïde
LDH : L-lactate déshydrogénase
LLC : Leucémie lymphoïde chronique
LMC : Leucémie myéloïde chronique

M
MCT : Mono-carboxylates
MDR : Multidrug resistance
ME : Microscope électronique
MEP : Progéniteurs communs mégacaryocytaire-érythroïde
MET : Microscope électronique en transmission
Mg : Milligramme
Mg^{2+} : Magnésium
MGG : May-Grünwald-Giemsa
NH_3 : Ammoniac
MMI : Membrane mitochondriale interne
MME : Membrane mitochondriale externe
MPC : Mitochondrial pyruvate carrier
MPO : Myéloperoxydase
MPP : progéniteurs multipotents
MO : Moelle Osseuse
Mono : Monocytes
mV : MilliVolt

N
NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide
NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NASDA : Naphtol-ASD-Acétate
NCL-1 : Nuclear protein 1
NF1 : Neurofibromatose 1
NFS : Numération Formule Sanguine
NGS : Séquençage de nouvelle génération
NH_3 : Ammoniac
NK : Natural killer
Nm : Nanomètre
Non-CSL : Cellules leucémique non-souche
NOS : Monoxyde d'azote
NPM1 : Nucleophosmin 1
NRF : facteur respiratoire nucléaire
NSG : NOD/SCID/IL2Rγ-/-

O
O_2 : Oxygène
O_2^- : Anion superoxyde
OMS : Organisation mondiale de la santé
OxPhos : Phosphorylation oxydative

P
P-gp : Glycoprotéine P
PC : Pyruvate carboxylase
PDH : Pyruvate déshydrogénase
PDHK : pyruvates déshydrogénases kinases
PDK : Pyruvate déshydrogénase kinase
PDP : Pyruvate déshydrogénase phosphatase
PDX : Xénogreffe dérivée de patient
PEP : phosphoénol pyruvate
PGC1alpha : PPARg coactivateur 1 alpha
Phe : Phenylalanine
Pi : Phosphate inorganique
PK : Pyruvate kinase
PTP : Pore de transition de perméabilité

Q
Q10 : Ubiquinone
Q10H2 : Ubiquinol
qPCR : PCR quantitative

R
RCP : Réunion de concertation pluridisciplinaire

RE : Réticulum endoplasmique
RMN : résonance magnétique nucléaire
Rot : Roténone
RT-PCR: réaction en chaîne par polymérase de transcription inverse
RUNX1 : RUNX family transcription factor 1

S
SC : Sous-cutané
SCENITH : Single-cell energetic metabolism by profiling translation inhibition
SLC2A5 : Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 5
SM : Spectrométrie de masse
SMD : Syndrome myélodysplasique
SMP : Syndrome myéloprolifératif
SOD : superoxyde dismutase
SRC : Spare Reserve Capacity

T
T : Translocation
TFAM : facteur de transcription mitochondrial A
TK : Tyrosine Kinase
TMRE : Tetramethylrhodamine ethyl ester
TMRM : Tetramethylrhodamine methyl ester
TNB : 5-thio-2-nitrobenzoic acid
TP53 : *Tumor protein 53*

V
VIH : virus de l'immunodéficience humaine
VHB : virus de l'hépatite B
VHC : virus de l'hépatite C

W
Wt: Wild type
WT1 : Wilms' Tumor

Table des matières

Introduction **23**

I. Physiologie de l'hématopoïèse **25**

a) Définition **25**

b) Compartiment sanguin **25**

c) Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) **26**

d) Différenciation hématopoïétique **27**

e) Caractéristiques immunophénotypiques des CSH et de ses progéniteurs **29**

f) Localisation **30**

g) Régulation et dérégulation de l'hématopoïèse **31**

II. Leucémie aiguë myéloïde (LAM) **32**

a) Définition **32**

b) Épidémiologie **32**

c) Étiologie **33**

d) Physiopathologie **34**

1) Leucémogénèse 34
2) Abérration d'anomalies génétiques et moléculaires 34
3) Hétérogénéité clonale 36

e) Symptomatologie **37**

f) Démarche diagnostique **38**

1) La Numération de la Formule Sanguine (NFS) 38
2) Le myélogramme 39
3) L'étude cytochimique 39
4) L'immunophénotypage 40
5) La cytogénétique 43
6) La biologie moléculaire 43
7) Les autres examens biologiques 43

g) Classifications **44**

1) Classification Franco-américano-britannique (FAB) 44
2) Classification de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) 45
3) Classification European Leukemia Net (ELN) 46

h) Prise en charge **47**

1) Données historiques 48
2) Objectif thérapeutique 49
3) Thérapies conventionnelles 50
4) Allogreffe 53
5) Prise en charge des signes cliniques 55
6) Rechute : Mutation, Maladie résiduelle, Dormance cellulaire / Maladie réfractaire 56
7) Innovations thérapeutiques 57
8) Médecine de précision 63

i) Limite actuelle **64**

III. Métabolisme énergétique mitochondrial 65

a) Acteurs moléculaires du métabolisme énergétique 65
1) La glycolyse 66
2) Le devenir du pyruvate 67
3) Le cycle de Krebs 68
4) La bioénergétique mitochondriale 70

b) Métabolisme énergétique d'une cellule saine hématopoïétique 73
1) Cellules souches hématopoïétiques 73
2) Progéniteurs hématopoïétiques 73
3) Cellules hématopoïétiques différenciées 74

c) Métabolisme mitochondrial énergétique des LAM 75
1) Cellules souches leucémiques 75
2) Cellules leucémiques en prolifération 75
3) Métabolisme de la LAM : Nouvelle approche diagnostique ? 75
4) Comment cibler les LAM par l'intermédiaire du métabolisme comme approche thérapeutique ? 76

IV. Évaluation du métabolisme énergétique mitochondrial 77

a) Ultrastructure et dynamique mitochondriale 77
1) Microscopie électronique (ME) 77
2) Microscopie fluorescente confocale / Time-laps 78

b) Production d'ATP 78

c) Single Cell ENergetIc metabolism by profilIng Translation inhibition (SCENITH) 79

d) Sondes fluorescentes utilisables en cytométrie en flux 80
1) Potentiel de membrane mitochondriale 80
2) Masse mitochondriale 83
3) Espèces réactives de l'oxygène = ERO 84

e) Consommation d'oxygène 87
1) Électrodes de Clark 87
2) Fluorimètres 89

f) Quantification de l'ADNmt 92

g) Signature de gènes codant pour des protéines mitochondriales 93

h) Activités enzymatiques des complexes de la chaîne respiratoire 93

i) Métabolomique & Fluxomique 99
1) À partir de cellules leucémiques 99
2) À partir du plasma des patients atteints de LAM 101

j) Mesure de la capacité de rétention calcique (CRC) 101

k) Autres techniques en lien avec le métabolisme énergétique mitochondrial 102
1) Mesure de l'ouverture du pore de perméabilité (PTP) 102
2) Sensibilité au priming mitochondrial = apoptose 103

V. Le métabolisme mitochondrial : Biomarqueur potentiel ? 106

a) Qu'est-ce qu'un biomarqueur ? 106

b) Biomarqueurs prédictifs de la réponse aux traitements et pronostiques 107

c) Perspective du métabolisme mitochondrial 108

Conclusion & Perspectives 110

Tableaux

Tableau 1 : Classification des LAM selon l'Organisation Mondiale de la Santé 46
Tableau 2 : Classification pronostique des LAM basée sur les données génétiques selon l'ELN 2022 47
Tableau 3 : Les différents types de greffon de l'allogreffe 54
Tableau 4 : Les différentes sondes de potentiel de membrane et leurs caractéristiques 81
Tableau 5 : Les différentes techniques évaluant le métabolisme énergétique 105

Figures

Figure 1 : Schéma de l'évolution de la prise en charge des patients, *d'après Roche* 23
Figure 2 : Composition du sang après centrifugation sur un coussin de sucrose (Ficoll) 26
Figure 3 : Différenciation cellulaire 27
Figure 4 : Représentation schématique de l'hématopoïèse du sujet adulte sain, *adapté de Metcalf* 28
Figure 5 : Différenciation des CS et des progéniteurs et leurs caractérisations immunophénotypiques 30
Figure 6 : Les sièges de l'hématopoïèse au cours de la vie, *d'après Wang and Wagers* 31
Figure 7 : Schéma de la différence de la composition sanguine entre patient sain et leucémique 32
Figure 8 : L'ensemble des étiologies pouvant amener à la LAM 34
Figure 9 : Schéma de la physiopathologie de la LAM, *d'après Craver, Brianna M., et al* 35
Figure 10 : Schéma de l'évolution clonale de la leucémie primaire à la rechute, *adapté de Li Ding* ... 36
Figure 11 : Schéma de l'expression des antigènes pendant la différenciation neutrophile, *adaptée de A. ORfao, EJNet Flow MDS, Amsterdam* 41
Figure 12 : Score de l'European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL), permettant de caractériser les LA 42
Figure 13 : Schéma de l'hématopoïèse et des différents sous-types de LAM associés au blocage dans la différenciation hématopoïétique, *d'après Krause Daniela S., et al* 44
Figure 14 : Les différents types cytologiques (coloration May-Grundwald-Giemsa) de LAM selon l'ancienne classification FAB, (source ASH Image Bank) 45
Figure 15 : Schéma de l'itinéraire des cellules mutées au traitement, *d'après Garg, Manoj, et al* 49
Figure 16 : Schéma des différentes thérapeutiques dans la LAM 50
Figure 17 : Structure chimique de la Daunorubicine 51
Figure 18 : Structure chimique de la Cytarabine 52
Figure 19 : Déroulement d'une allogreffe 53
Figure 20 : Schéma des problématiques du traitement des LAM 56
Figure 21 : Nouveaux traitements approuvés par la FDA et l'EMA 57
Figure 22 : Mécanisme d'action du Vénétoclax 58
Figure 23 : Mécanisme d'action des inhibiteurs d'Isocitrate Déshydrogénase (IDH) 61
Figure 24 : Schéma des critères de prise en charge des patients, *d'après Boissel, Nicolas et al., et Papaemmanuil Elli et al.* 63
Figure 25 : Courbes de survie selon la classification ELN appliquée à une large cohorte de patients, *d'après Tobias Herold et al* 64
Figure 26 : Schéma des relations entre le catabolisme et la synthèse d'ATP 65
Figure 27 : Finalité de la voie glycolytique 66
Figure 28 : Bilan énergétique de la glycolyse 67
Figure 29 : Schéma représentant les différentes voies cataboliques du pyruvate 68

Figure 30 : Schéma représentant les principales réactions du cycle de Krebs 69
Figure 31 : Schéma des complexes de la chaîne respiratoire 72
Figure 32 : Évolution métabolique des cellules hématopoïétiques au cours de la différenciation 74
Figure 33 : Processus métaboliques actifs au sein des cellules souches leucémiques et des blastes leucémiques 75
Figure 34 : Lien entre la phosphorylation oxydative et la LAM 76
Figure 35 : Mécanisme d'action de la luciférine 79
Figure 36 : Principe de la technique SCENITH 80
Figure 37 : Mécanisme d'action du MitoSOX 85
Figure 38 : Mécanisme d'action du H_2DCFDA 86
Figure 39 : Schéma de l'électrode de Clark 88
Figure 40 : Mécanisme d'action du Seahorse® 91
Figure 41 : Structure chimique de l'Ubiquinone 94
Figure 42 : Activité enzymatique du complexe I de la chaîne respiratoire dans des cellules LAM, *d'après Erdem et al,* 95
Figure 43 : Mécanisme d'action du Dichlorophénolindophénol 95
Figure 44 : Activité enzymatique du complexe II de la chaîne respiratoire dans des cellules LAM, *d'après Erdem et al,.* 96
Figure 45 : Comparaison de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire entre cellules saines et LAM, *d'après Sriskanthadevan et al,* 97
Figure 46 : Cascade de réaction chimique découlant de l'ATP 98
Figure 47 : Mécanisme d'action de la citrate synthase 98
Figure 48 : Comparaison de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire entre cellules saines et LAM à la suite d'une normalisation par la citrate synthase, *d'après Sriskanthadevan et al,* 99
Figure 49 : Évaluation du PTP par la méthode Calcéine-Cobalt 103
Figure 50 : Classification des biomarqueurs selon leurs positionnements cliniques 107
Figure 51 : Relation entre la capacité de réserve mitochondriale des blastes de patients et la réponse aux traitements anticancéreux Vénétoclax + Cytarabine, *d'après Bosc et al,.* 109

Introduction

Ces dernières années, la prise en charge des cancers a évolué et ce, notamment grâce aux avancées de la biologie moléculaire. Dans les années 2000, il y a eu un changement de paradigme ; désormais le traitement du cancer est sélectionné en fonction de l'organe mais également des biomarqueurs altérés. En effet, l'ensemble de ces éléments permet de préciser la spécificité tumorale et d'établir un profil personnalisé du patient. Actuellement, l'aboutissement vers une médecine de précision utilisant un traitement unique en fonction du profil génomique de la tumeur de chaque patient prend tout son sens (Figure 1).

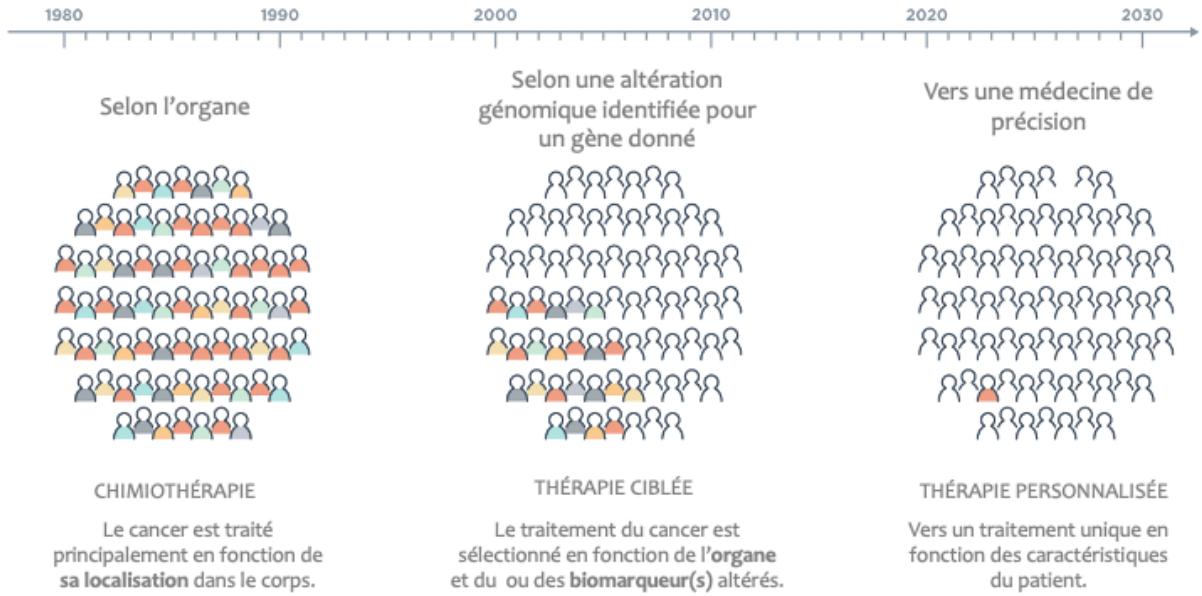

Figure 1: Schéma de l'évolution de la prise en charge des patients, *d'après Roche*

Le concept de « médecine personnalisée » comprend de nombreuses définitions, qui évoluent au cours du temps et de nombreux synonymes comme « médecine de précision », « médecine individualisée » ou encore « médecine stratifiée ». Focalisée sur le patient, la médecine de précision est une approche émergente des soins de santé dans laquelle les caractéristiques d'un individu, y compris son profil génétique, guident les décisions cliniques[1].

Selon la Food Drug Administration (FDA), la médecine personnalisée a pour objectif de fournir « *le bon traitement, au bon patient, au bon moment* » afin d'améliorer l'efficacité des traitements et, par conséquent la qualité de vie du patient[2,3]. La 1ère étape pour identifier et faire correspondre le bon traitement au bon patient selon la FDA repose sur un diagnostic de haute précision. La Commission Européenne (CE), quant à elle, définit la médecine de précision d'un point de vue technique, en faisant référence aux outils de diagnostic. Cette médecine personnalisée est devenue incontournable en cancérologie, puisqu'elle permet ainsi de choisir

le traitement le plus adapté à chaque patient à partir des informations biologiques de sa tumeur et de son environnement. Ainsi, la médecine personnalisée en oncologie, pilier de l'innovation thérapeutique, se fonde sur les avancées scientifiques, la génération de données et les nouvelles technologies de diagnostic, d'où l'importance aujourd'hui de mieux caractériser les tumeurs pour pouvoir trouver le bon traitement pour le bon patient.

Le lien entre cancer et mitochondries s'est tissé au gré de l'avancement des connaissances dans ces deux domaines. Il y a des étapes clés qui ont mené à la notion que l'étude du métabolisme mitochondrial dans le cancer était un élément important : notamment les travaux de Warburg (1956) qui proposent que les cellules cancéreuses présentent des altérations mitochondriales, la mise en évidence du rôle central de la mitochondrie dans les mécanismes de la mort cellulaire programmée et en particulier de la mort induite par les molécules anticancéreuses[4,5]. Ainsi, un certain nombre de travaux déjà publiés souligne l'intérêt d'évaluer le métabolisme énergétique mitochondrial dans différents types de cancers tels que le mélanome[6], le cancer de la prostate[7], le cancer du poumon[8,9], le cancer du sein triple négatif[10,11] et la leucémie aiguë myéloïde (LAM)[12–17]. **À partir des éléments de la littérature scientifique, nous déterminerons si le métabolisme énergétique mitochondrial peut-être un biomarqueur de la réponse au traitement en particulier dans les LAM**.

Dans un premier temps, l'état de l'art de la physiologie de l'hématopoïèse sera abordé. En effet, la compréhension des processus physiologiques est indispensable pour mieux appréhender la physiopathologie, le diagnostic, le traitement et le suivi des pathologies tel que la LAM.

Dans un second temps, ce manuscrit se focalisera sur l'état de l'art de la LAM avec des éléments permettant de démontrer que le métabolisme énergétique mitochondrial influence la réponse aux traitements des LAM. Cette partie amènera à introduire par la suite le métabolisme énergétique d'une cellule.

Dans un autre paragraphe, le métabolisme énergétique mitochondrial sera évalué en tant que biomarqueur clinique d'évaluation. Pour cela, différentes méthodes de mesure du métabolisme mitochondrial seront évoquées, en passant par l'ultrastructure mitochondriale, la masse mitochondriale, le potentiel de membrane, la consommation d'oxygène, l'acidité extracellulaire, le taux d'Adénosine triphosphate (ATP), l'activité enzymatique des complexes de la chaîne respiratoire, le profilage immuno-métabolique, le priming mitochondrial, la quantification de l'Adénosine désoxyribonucléique (ADN) mitochondrial et les signatures de gènes.

Pour conclure, une question se posera sur le choix du meilleur de ces biomarqueurs pour une utilisation en clinique.

I. Physiologie de l'hématopoïèse

a) Définition

L'hématopoïèse est l'ensemble des mécanismes physiologiques qui concourent à la fabrication et au remplacement continu et régulé de milliards de cellules sanguines ayant une durée de vie limitée, dès la formation du fœtus et tout au long de l'existence. Elle implique des capacités de prolifération/de renouvellement, de différenciation/de maturation et d'adaptation par rapport aux besoins. Ainsi, lorsqu'il y a une diminution du nombre de cellules dans un type de lignée cellulaire, l'hématopoïèse va augmenter la production de la lignée qui fait défaut. Au contraire, lorsqu'il y a une augmentation d'une lignée ou plusieurs lignées, un frein va être mis en place pour diminuer le nombre de cellules ; c'est là qu'intervient l'apoptose ou la mort cellulaire programmée. Ainsi cette hématopoïèse qui, chez l'adulte, se fait principalement dans la moelle osseuse (MO), est capable de produire plusieurs milliards de cellules par jour, par exemple, 50 milliards de polynucléaires, 100 milliards de plaquettes et 200 milliards d'hématies par jour[18–20].

b) Compartiment sanguin

Comme expliqué précédemment, l'hématopoïèse correspond à l'ensemble des mécanismes impliqués dans la production des différentes cellules sanguines. Le sang est composé de cellules en suspension dans le plasma. Le plasma peut d'ailleurs être séparé des éléments figurés du sang. Le plasma représente 55% du sang qui lui-même est composé de 91,5% d'eau, 7% de protéines et 1,5% d'autres solutés, tels que des nutriments, des gaz, des vitamines et des déchets. Les 45% restant sont représentés par les éléments figurés du sang, qui présentent des fonctions particulières (Figure 2)[21,22] :

- Les érythrocytes, donnent la couleur rouge du sang, puisqu'ils contiennent le pigment de l'hémoglobine. Il y en a entre 4,2 et 5,7 Tera/L, c'est-à-dire, 10^{12} hématies par litre de sang. La fonction des globules rouges est le transport de l'oxygène vers le tissu.
- Les leucocytes, fine couche de cellules qui apparaissent blanches représentant 4 à 10 Giga/L, c'est-à-dire 10^9 globules blancs par litre de sang. Il en existe différents types dont les polynucléaires, les monocytes et les lymphocytes. Les globules blancs ont pour rôle la défense contre les infections.
- Les plaquettes, avec une proportion de 150 à 450 x 10^9 cellules/L de sang, jouent un rôle dans l'hémostase primaire et la coagulation.

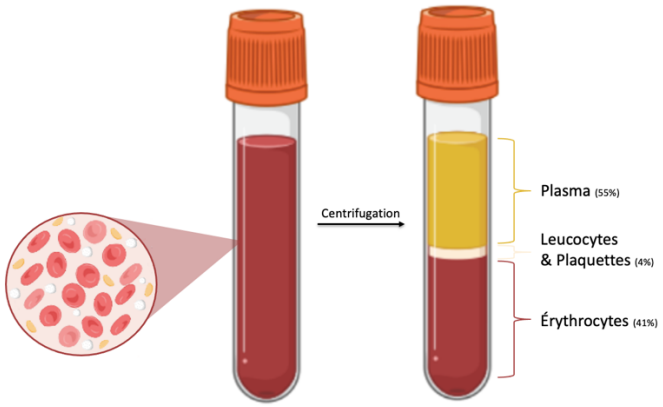

Figure 2: Composition du sang après centrifugation sur un coussin de sucrose (Ficoll)

Ces différentes populations de cellules sanguines sont distinguables et reconnaissables au microscope à partir de frottis sanguins. Il faut savoir que les cellules sanguines sont, en majorité, des cellules matures et différenciées, qui sont à l'origine de l'ensemble des fonctionnalités permettant à l'organisme d'agir. Elles ont une capacité de division quasiment nulle, à l'exception de certains sous-types comme les lymphocytes T activés. Malgré cette division quasi nulle, les taux dans le sang sont assez constants et élevés. Leur durée de vie est relativement limitée, de quelques heures à quelques années : 7 à 10 jours pour les plaquettes, 120 jours pour les hématies, quelques mois pour les monocytes et quelques mois à plusieurs années pour les lymphocytes. C'est pourquoi, pour constituer ce stock constant de cellules sanguines, il y a une nécessité d'avoir une production quantitativement importante. Les cellules souches hématopoïétique (CSH) sont à l'origine de ces différentes cellules.

c) Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH)

Dans le schéma général de l'hématopoïèse, les cellules souches (CS) constituent le premier compartiment. Les CS ne sont pas reconnaissables morphologiquement mais par leurs capacités fonctionnelles. Une CS est une cellule présente dans les organismes pluricellulaires qui a pour propriétés de pouvoir s'auto-renouveler pour produire d'autres CS et se différencier en différents types spécialisés[23,24]. Les types de CS sont au nombre de trois (Figure 3)[25] :

- Totipotentes : Ce type de CS peut se différencier en tous les types cellulaires, embryonnaires et extra-embryonnaires et donner à lui seul un organisme vivant en entier.
- Pluripotentes : Ce sont les cellules filles des cellules totipotentes. Elles peuvent générer les cellules des 3 lignées germinales : endodermique, mésodermique, et ectodermique mais ne peuvent plus générer les cellules du trophectoderme à l'origine des cellules des annexes embryonnaires. Elles ont donc la capacité de donner un organisme en entier mais ne peuvent fournir l'environnement propice à son développement, les annexes embryonnaires.

- Multipotentes : Elles peuvent donner différents types cellulaires spécifiques d'un tissu, tels que les CS hématopoïétiques, mésenchymateuses, neurales...

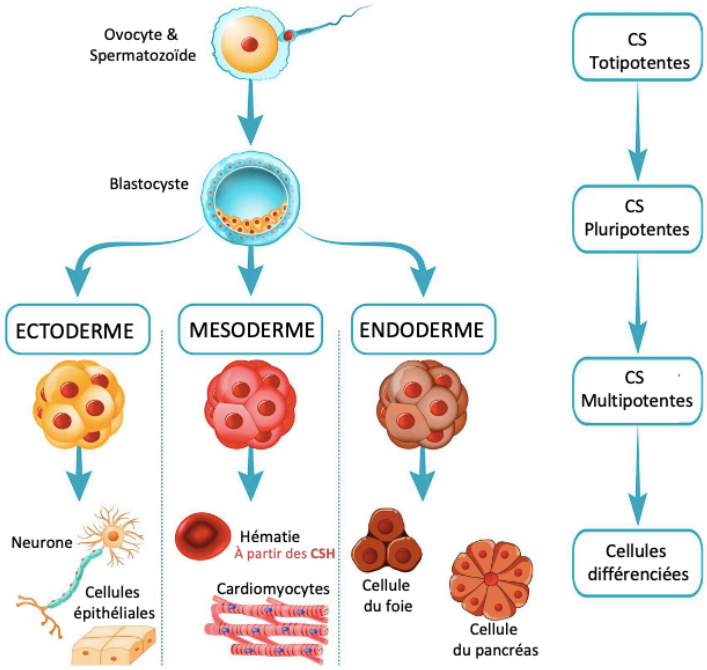

Figure 3: Différenciation cellulaire (CS, Cellule souche ; CSH : Cellule souche hématopoïétique)

L'hématopoïèse est assurée par des cellules, dites cellules souches multipotentes ou cellules souches primitives. Les CSH sont donc des cellules souches adultes multipotentes à l'origine de toutes les lignées hématopoïétiques et qui résident au sein d'une structure anatomique et fonctionnelle, la niche hématopoïétique. C'est dans cette niche que les CSH se caractérisent par plusieurs propriétés : leur capacité d'auto-renouvellement (division symétrique) et leur capacité de différenciation (division asymétrique) en cellules matures sous l'influence de signaux[26–28]. Ainsi, la différenciation et le renouvellement des trois lignées matures du sang dérivent d'une CSH multipotente qui est située dans la MO chez l'adulte.

d) Différenciation hématopoïétique

Les CSH engendrent successivement et de manière hiérarchique les progéniteurs hématopoïétiques afin de générer soit des précurseurs lymphoïdes produisant des lymphocytes, soit des précurseurs myéloïdes aboutissant aux plaquettes, aux hématies, aux polynucléaires et aux monocytes. Plus précisément, les CSH génèrent en premier lieu des progéniteurs multipotents (MPP), qui se différencient en progéniteurs communs myéloïdes (CMP) et lymphoïdes (CLP). Ces progéniteurs communs sont à l'origine des cellules érythroïdes et myéloïdes d'une part, et aux cellules lymphoïdes d'autre part. En effet, les CMP, appelés

également Colony Forming Unit- Granulocyte, Erythroblast, Megakaryocyte, Monocyte (CFU-GEMM) se différencient en GMP ou Colony Forming Unit-Granulocyte, Monocyte (CFU-GM) ou en progéniteurs communs mégacaryocytaire-érythroïde (MEP). Ces progéniteurs vont eux-mêmes se différencier en progéniteurs tardifs, qui ne donneront naissance qu'à une lignée cellulaire, en se différenciant en précurseurs morphologiquement identifiables (Figure 4)[29].

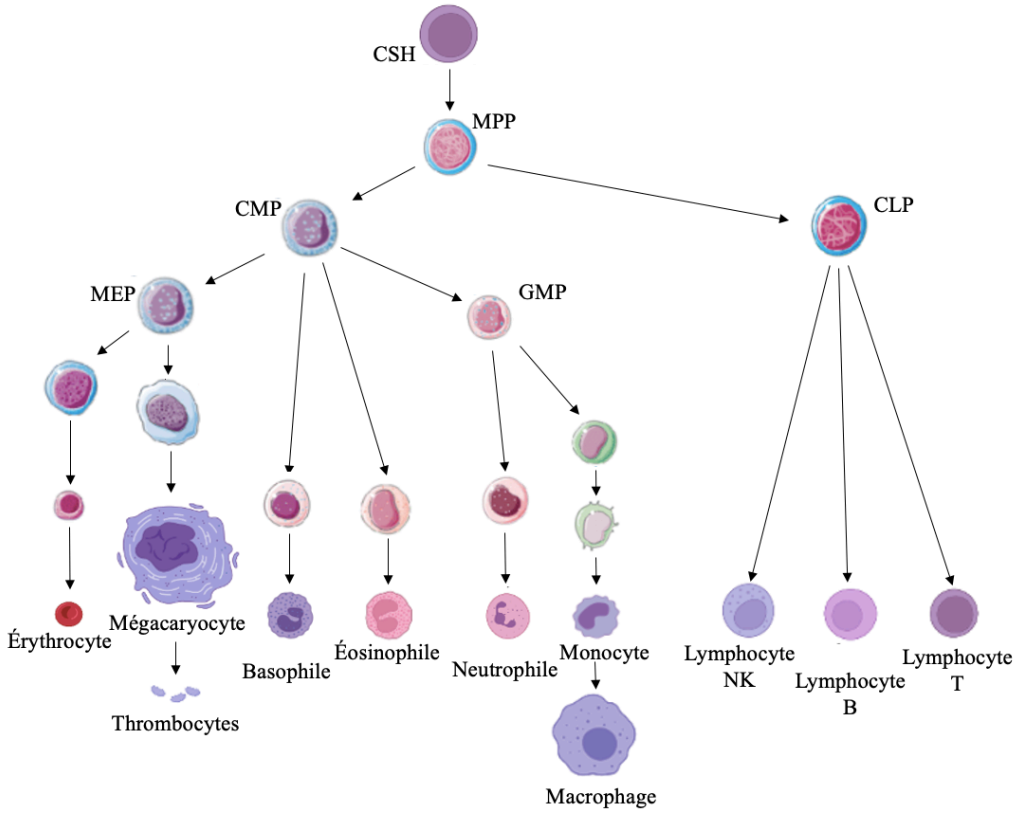

Figure 4: Représentation schématique de l'hématopoïèse du sujet adulte sain, *adapté de Metcalf*[30] (CSH, Cellule souche hématopoïétique ; MPP, Progéniteurs multipotents ; CLP, Progéniteurs communs lymphoïdes ; NK, Natural killer ; CMP, Progéniteurs communs myéloïdes ; GMP, progéniteur granulocytaire-monocytaire ; MEP, progéniteur commun mégacaryocytaire-érythroïde)

En fonction du compartiment cellulaire, les cellules présentent différentes propriétés et capacités. Les CSH représentent 0,01% des cellules de la MO. Elles sont capables d'auto-renouvellement en se divisant asymétriquement. Elles sont également multipotentes et font preuve d'une plasticité importante, puisqu'elles sont capables de produire l'ensemble des cellules du sang. Les progéniteurs, eux, représentent 0,1% des cellules de la MO et ont un pouvoir d'auto-renouvellement plus faible et un potentiel de prolifération et un engagement progressif et irréversible vers une lignée[30]. Ce sont des cellules qui ne sont pas morphologiquement reconnaissables, mais identifiables grâce aux marqueurs cellulaires à leur surface. Les précurseurs sont les principales cellules qui composent la MO (>99%), identifiables morphologiquement tout comme les cellules matures.

e) Caractéristiques immunophénotypiques des CSH et de ses progéniteurs

Il n'existe pas de marqueurs spécifiques des CSH. Cependant, à l'aide de certains marqueurs phénotypiques, il est possible d'exclure les progéniteurs, les précurseurs et les cellules matures pour obtenir une population hétérogène de cellules immatures. Le marqueur le plus répandu pour identifier les cellules les plus immatures est le CD34[31].

Ainsi, chez l'Homme, les cellules CD34+ CD38- CD90+ CD45RA- (HLA DR- CD33- CD133+) ne présentant aucun marqueur de différenciation, sont considérées comme appartenant au compartiment des CSH[32–34].

Dans la littérature, les CSH sont également caractérisées par un taux d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) particulièrement faible[35–37]. Les MPP, qui prennent naissance à partir de ces CSH, perdent phénotypiquement le CD90 (CD34+ CD38- CD90- CD45RA-)[33,34]. Le compartiment CD34+ CD38+, en aval dans le processus hématopoïétique, est composé des MEP, CMP et GMP, qui se différencie selon leur expression du CD123 et de CD45RA[38,39]. Les CMP sont caractérisés comme CD34+ CD38+ CD45RA- CD123+ (CD33+ CD13 + HLA DR+), les GMP comme CD34+ CD38+ CD45RA+ CD123+ et les MEP comme CD34+ CD38+ CD45RA- CD123- (Figure 5)[32,40].

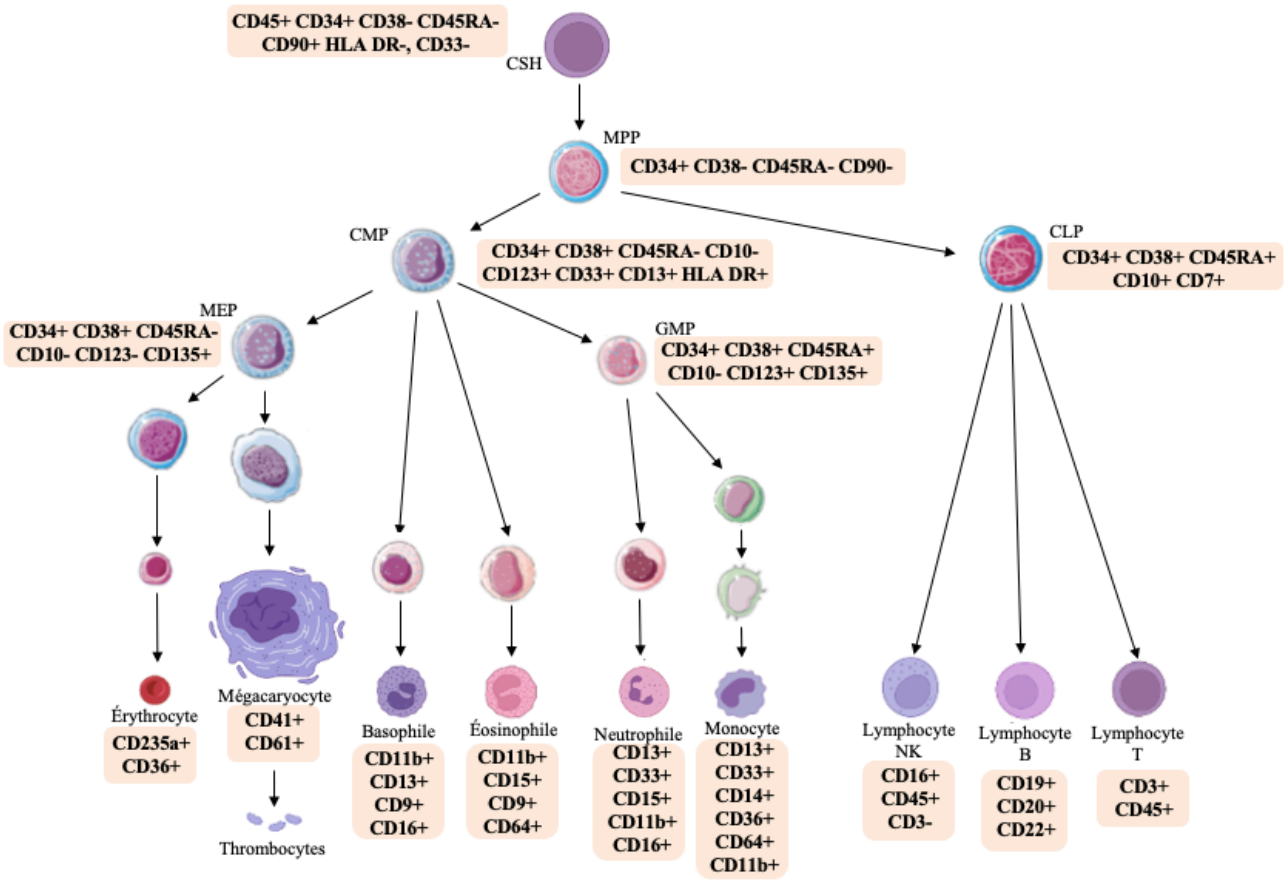

Figure 5: Différenciation des CS et des progéniteurs et leurs caractérisations immunophénotypiques (CSH, Cellule souche hématopoïétique ; MPP, Progéniteurs multipotents ; CLP, Progéniteurs communs lymphoïdes ; NK, Natural killer ; CMP, Progéniteurs communs myéloïdes ; GMP, progéniteur granulocytaire-monocytaire ; MEP, progéniteur commun mégacaryocytaire-érythroïde)

f) Localisation

L'hématopoïèse conduit au renouvellement cellulaire permanent principalement au niveau de la MO. Il faut préciser cependant que le siège de l'hématopoïèse est différent tout au long de la vie (Figure 6). Ainsi, avant la naissance, l'hématopoïèse s'effectue déjà en 3 stades qui impliquent successivement, le sac vitellin, le foie et la rate et enfin la moelle osseuse :

- Stade primitif mésodermique : 21ème et 60ème jour de gestation avec une érythropoïèse primitive ou embryonnaire.
- Stade hépato-splénique : 40ème jour au 6ème mois avec une hématopoïèse complète, majoritairement érythroblastique, impliquant le foie et la rate.
- Stade médullaire : 100ème jour jusqu'à la naissance et au-delà par la moelle osseuse.

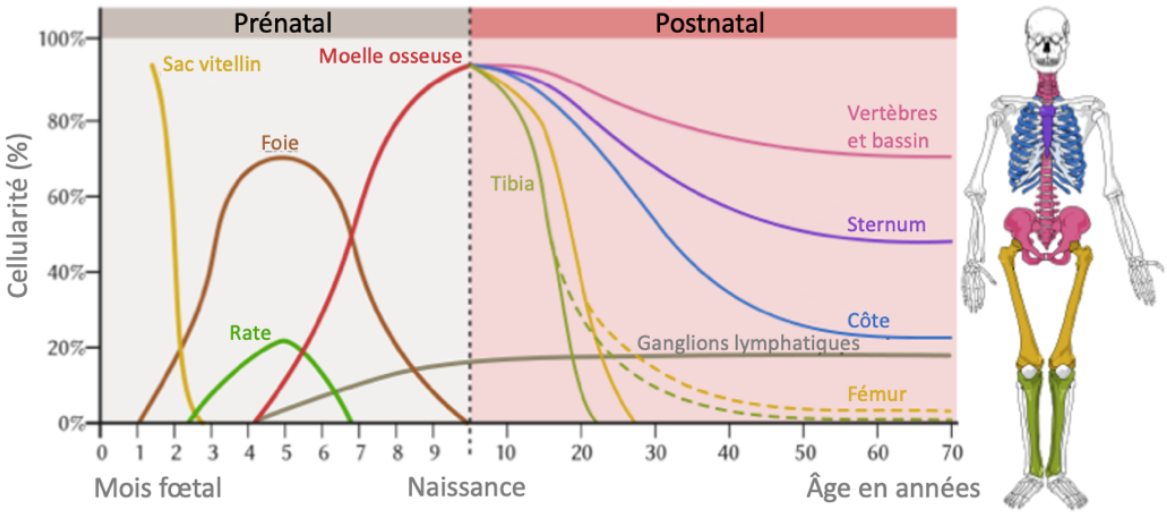

Figure 6: Les sièges de l'hématopoïèse au cours de la vie, *d'après Wang and Wagers*[41]

Ainsi chez l'adulte, l'hématopoïèse est essentiellement présente au niveau du sternum, du sacrum, des vertèbres, du crâne et des épiphyses puisque la MO se situe dans la cavité des os[42].

g) Régulation et dérégulation de l'hématopoïèse

L'hématopoïèse est soumise à un contrôle et une régulation à tous les niveaux. Nous pouvons ainsi décrire 3 éléments régulateurs :

- *Le « microenvironnement » médullaire :* Il procure aux CS les conditions anatomiques et intercellulaires satisfaisantes pour assurer l'hématopoïèse. Le tissu de soutien sécrète des matrices extracellulaires et des facteurs de croissance. Les matrices extracellulaires permettent l'adhésion des CS, en particulier grâce au collagène.
- *Les vitamines et oligo-éléments :* Des vitamines (vitamine B12 et acide folique) sont nécessaires à la synthèse de l'ADN et donc à la division cellulaire. D'autres éléments, comme le fer, sont nécessaires à la fabrication des protéines spécifiques des lignées, comme la synthèse de l'hémoglobine.
- *Les facteurs de croissance médullaires :* Les facteurs de croissance hématopoïétiques sont des substances (glycoprotéines) agissant comme des hormones. Certaines font partie de la famille des cytokines et des interleukines (IL). Ces molécules reconnaissent leurs cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques[43].

Cependant, il peut y avoir une dérégulation de ce processus. En effet, une perturbation de l'hématopoïèse normale peut conduire à des cancers du sang. En fonction de la lignée affectée, c'est-à-dire les CS de la MO à partir desquelles elle se développe, les patients vont développer

une leucémie dite lymphoïde ou myéloïde. En fonction de la vitesse d'évolution de la pathologie, une leucémie peut être soit à un stade chronique (les leucémies se développent lentement et restent longtemps silencieuses) soit à un stade aiguë (les leucémies se manifestent brutalement et sont rapidement diagnostiquées). Ainsi, quatre principaux types de leucémies se distinguent (Figure 7) :

- **LLC** : Leucémie Lymphoïde Chronique
- **LAL** : Leucémie Aiguë Lymphoïde
- **LMC** : Leucémie Myéloïde Chronique
- **LAM** : Leucémie Aiguë Myéloïde

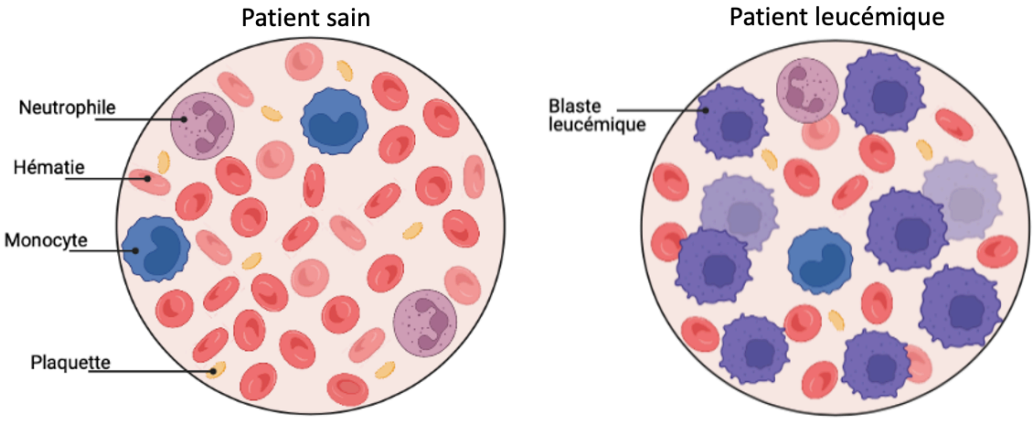

Figure 7: Schéma de la différence de la composition sanguine entre patient sain et leucémique

Avant de poursuivre ce manuscrit, il est important de souligner que ce travail de thèse sera uniquement focalisé sur la LAM.

II. Leucémie aiguë myéloïde (LAM)

a) Définition

Une LAM est un ensemble d'hémopathies malignes liées à la prolifération anormale de cellules immatures et clonales de la lignée myéloïde dans la MO. Les précurseurs des cellules sanguines sont bloqués à un stade précoce de leur différenciation, qui sont les cellules souches leucémiques (CSL) et donnent naissance à l'ensemble des blastes leucémiques. Cette expansion clonale peut conduire à un hiatus leucémique, c'est-à-dire une absence de formes intermédiaires entre le blaste et le polynucléaire[44,45].

b) Épidémiologie

Les LAM se définissent comme une maladie rare représentant 1 à 2% des cancers de l'adulte et 10 à 15% des hémopathies malignes. D'après les données de ces dernières années, elles

représentent 80% des leucémies aiguës (LA) de l'adulte, avec un âge moyen de 67 ans. La LAM est légèrement plus fréquente chez les hommes que chez les femmes, mais le risque moyen au cours de la vie dans les deux sexes est d'environ 1,1. L'incidence estimée de cette maladie est autour de 3,5 cas pour 100 000 personnes/an (environ 3000 cas/an en France)[46,47].

Cette maladie peut se présenter à tout âge mais sa fréquence augmente avec l'âge. En fait, les LAM constituent la quasi-totalité des LA des personnes âgées, avec un âge médian de diagnostic de 67 ans. De ce fait, à plus de 65 ans, il passe à un ratio de 17,9 cas pour 100 000 personnes. En moyenne, l'âge de survenue de la maladie est de 66 ans chez l'homme et de 69 ans chez la femme. Les données épidémiologiques montrent donc clairement que l'incidence de LAM augmente avec l'âge, et cela de manière importante à partir de 65 ans. Ces données montrent à quel point la prise en charge de cette pathologie représente un enjeu, avec une incidence globale de 4 à 5 cas/100 000 habitants/an. En effet, les LAM représentent à elles seules 1,1% des cancers en 2021, avec un taux de survie globale à 5 ans de 24%[48]. C'est donc une maladie de très mauvais pronostic caractérisée par un excès de mortalité dans les 2 premières années après le diagnostic. La survie globale ne s'est pas beaucoup améliorée ces trente dernières années, avec une survie des patients de 30,5% (2012-2018), 5 ans après le diagnostic[49,50].

c) Étiologie

Dans la majorité des cas, l'étiologie est inconnue mais certains facteurs peuvent favoriser l'apparition de la pathologie. Au-delà de l'âge, d'autres facteurs de risque ont été associés au développement des LAM (Figure 8). En effet, les antécédents de maladie hématologique, les mutations génétiques (Trisomie 21, Syndrome de Fanconi, Wiskott-Aldrich, Neurofibromatose de Von Recklinghausen), les irradiations (Bombardements atomiques d'Hiroshima et de Nagasaki), l'exposition à des produits chimiques (benzène) ou à des traitements antérieurs par chimiothérapies et radiothérapies sont des facteurs de risque de la LAM. Il est reconnu que 2 classes de cytotoxiques sont concernées et peuvent être responsables de 10% des LAM : les agents alkylants (5 à 10 ans) et les inhibiteurs de topoisomérase II (1 à 5 ans). L'acutisation peut également être un facteur de risque, c'est-à-dire le passage d'une maladie de l'état chronique à l'état aigu et une évolution rapide vers une aggravation de la malignité, d'hémopathies préexistantes comme le syndrome myélodysplasique (SMD), le syndrome myéloprolifératif (SMP) ou des aplasies médullaires… et généralement ce sont des LA secondaires qui sont de mauvais pronostics[51–57].

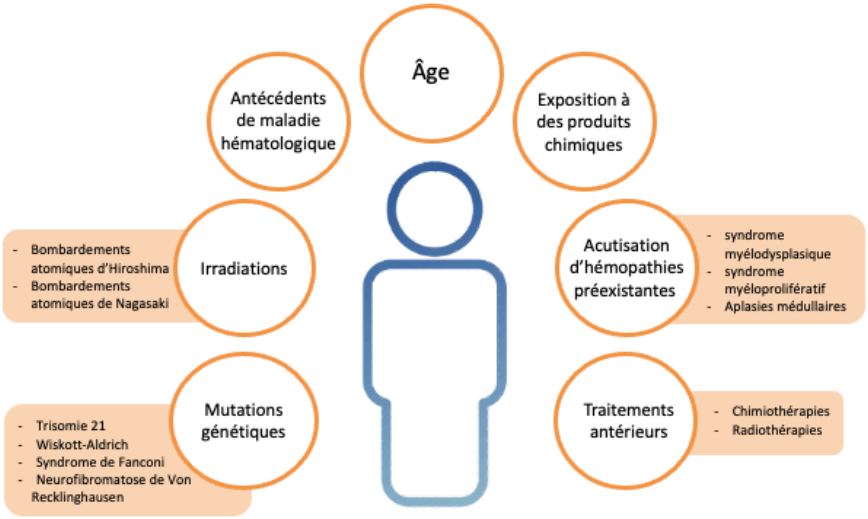

Figure 8: L'ensemble des étiologies pouvant amener à la LAM

d) Physiopathologie

1) *Leucémogénèse*

La leucémogénèse est désignée comme l'ensemble des mécanismes responsables de la transformation d'une cellule de l'hématopoïèse normale en cellule leucémique. Bien sûr le terme de « leucémogénèse » ne comprend pas uniquement les leucémies, mais également des lymphomes, SMP, SMD. Dans le cadre de la LAM, la physiopathologie est multi-étapes avec une combinaison d'altérations génomiques acquises clonales affectant la différenciation, la prolifération, la survie et l'auto-renouvellement[58].

2) *Abérration d'anomalies génétiques et moléculaires*

Les CS polyclonales conduisent à l'expansion des différentes lignées hématologiques. Des anomalies génétiques et moléculaires peuvent conduire à un blocage de la maturation. Ainsi, sans cette maturation, il ne va pas y avoir de différenciation d'une part des CSL et d'autre part des 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. Les CSL sont des cellules relativement quiescentes. D'ailleurs, les CSL peuvent être définies immunophénotypiquement comme des cellules CD34+ CD38- associées à un marqueur aberrant non présent sur les CSH saines, par exemple, CD45RA+ TIM3+ CLL-1+ CD97+. La présence de CSL est également associée à l'absence de CD90[59–61]. Les CSL ont une capacité d'auto-renouvellement aberrante et une prolifération indéfinie, donnant naissance à l'ensemble des blastes leucémiques (Figure 9)[62]. Ces blastes entraînent une absence de formes

intermédiaires entre le blaste et le polynucléaire, en bloquant la fonction et le développement des cellules sanguines matures.

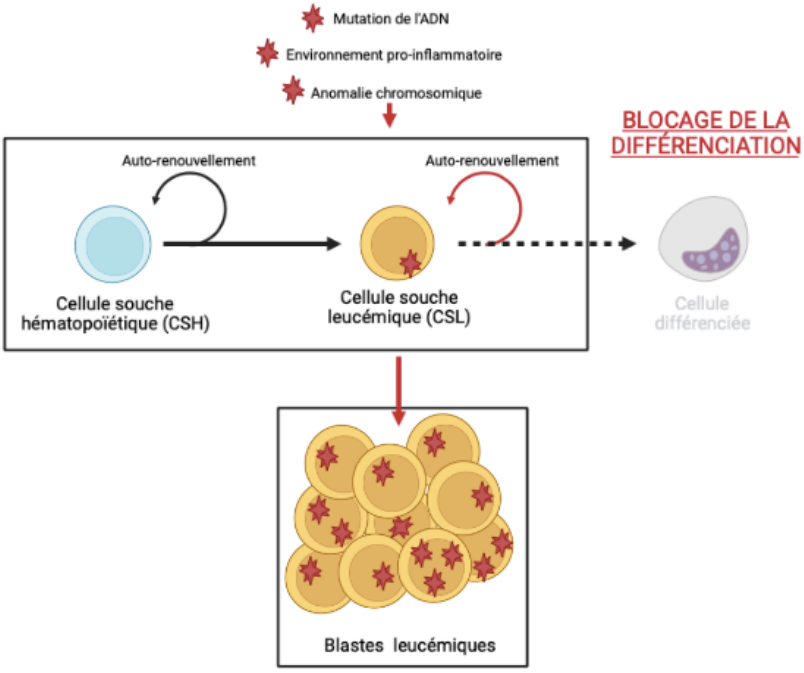

Figure 9: Schéma de la physiopathologie de la LAM, *d'après Craver, Brianna M., et al.*[62]

Ainsi, les LAM se développent après une accumulation d'aberrations génétiques, c'est-à-dire de translocations spécifiques, mutations et autres altérations génétiques. En effet, la caractérisation moléculaire de cellules leucémiques de patients atteints de LAM a révélé de multiples preuves montrant que la maladie est caractérisée le plus souvent par une dérégulation des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation hématopoïétique normale.

De plus, un certain nombre de mutations a également été associé à des gènes impliqués dans des voies de signalisation affectant la croissance cellulaire et l'apoptose. Ces anomalies moléculaires sont à l'origine de l'accumulation de cellules leucémiques grâce à une capacité de prolifération accrue et au blocage de la capacité de différenciation conférant aux cellules tumorales un avantage de survie tel que l'échappement à l'apoptose.

Ainsi, les mutations ont été regroupées en différentes classes :

- La classe I englobe des gènes codant pour des protéines de signalisation liées à une croissance cellulaire incontrôlée, à la survie et à la résistance à l'apoptose : Fms-like Tyrosine Kinase 3 (FLT3), Tyrosine-protein kinase (KIT), Janus Kinase 2 (JAK2), Neurofibromatosis type 1 (NF1).
- La classe II regroupe des altérations des facteurs de transcription conduisant à l'inhibition de la différenciation : Nucleophosmin 1 (NPM1), CCAAT-/enhancer binding protein alpha (CEBPA), RUNX Family Transcription Factor 1 (RUNX1).

- La classe III est constituée des mutations des régulateurs épigénétiques : DNA méthyltransférase 3 alpha (DNMT3A), Isocitrate déshydrogénase 1 et 2 (IDH1/IDH2), Additional Sex Combs Like 1 (ASXL1).
- La classe IV englobe les mutations des gènes suppresseurs de tumeurs : Tumor Protein 53 (TP53), Wilms' Tumor (WT1).
- La classe V regroupe les gènes impliqués dans la maturation d'acide ribonucléique (ARN).

Les expériences *in vivo* ont démontré qu'une seule mutation ne permettrait pas d'induire la leucémogénèse, mais que l'association des mutations était nécessaire.

3) *Hétérogénéité clonale*

Au diagnostic, les LAM ne sont pas des amas uniformes de cellules cancéreuses identiques mais présentent une grande hétérogénéité clonale, vu qu'elles possèdent un, voire plusieurs clones pathologiques (Figure 10)[63].

Ainsi, des mutations génétiques s'accumulent dans différents clones leucémiques qui coexistent chez un même patient. Lors d'une chimiothérapie, il y a d'une part, les clones résistants aux traitements qui pourront proliférer au détriment des clones sensibles aux traitements. Ce mécanisme va changer les caractéristiques mutationnelles du patient. D'autres part, une fois que les clones présentent les nouvelles mutations, conférant un avantage de résistance et de prolifération, ils vont pouvoir recoloniser le patient. Ainsi, comprendre l'hétérogénéité de la tumeur, être capable de contrer la résistance et développer des stratégies thérapeutiques adaptées sont des axes de recherche majeurs en oncologie hématologie pour les années à venir[64–68].

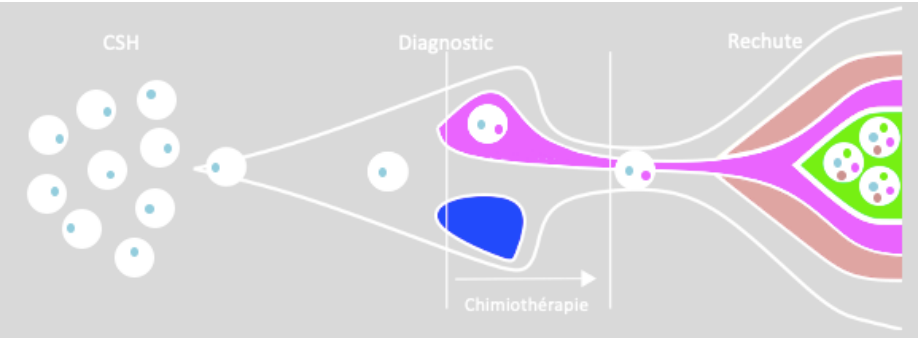

Figure 10: Schéma de l'évolution clonale de la leucémie primaire à la rechute, *adapté de Li Ding*[66]
(CSH : Cellule souche hématopoïétique)

L'architecture clonale et l'ordre d'apparition des mutations peuvent être déduits par l'étude des fractions de l'allèle variant lors d'un séquençage à haut débit.

D'ailleurs, bien que les LAM soient caractérisées par de nombreuses mutations somatiques, seules certaines d'entre-elles contribuent à la progression de la pathologie. Ainsi, la prolifération clonale de cellules médullaires immatures entraîne une altération de l'hématopoïèse. Cette altération amène à une infiltration de la moelle par des blastes > 20%, ce qui induit 2 conséquences :

- **Syndrome tumoral** avec infiltration secondaire par les cellules blastiques dans d'autres organes extra-médullaires.
- **Insuffisance médullaire** : prolifération leucémique au niveau médullaire et du tissu lymphoïde[69].

Ces 2 conséquences sont à l'origine de la symptomatologie de la LAM.

e) Symptomatologie

Les symptômes de la LAM peuvent apparaître seulement quelques jours ou semaines avant le diagnostic. La présentation clinique la plus courante est due à une hématopoïèse perturbée et aux troubles qui s'ensuivent, c'est-à-dire : Anémie, Thrombopénie et Granulocytopénie, représentatifs du syndrome d'insuffisance médullaire[69].

- Un syndrome anémique peut se manifester par une asthénie, des acouphènes, une faiblesse, une pâleur, un malaise, des signes d'hypoxie (une dyspnée d'effort, une tachycardie et des douleurs thoraciques à l'effort).
- Un syndrome hémorragique représenté par des hémorragies cutanées (purpura pétéchial, ecchymotique), des muqueuses (épistaxis, gingivorragies) ou viscérales (hématuries et les hémorragies gastro-intestinales), même si elles sont plus rares. Des hémorragies spontanées, notamment des hématomes intracrâniens ou intra-abdominaux, peuvent apparaitre au début chez les patients.
- Un syndrome infectieux avec la neutropénie peut entraîner une hyperthermie, des pneumopathies, des septicémies, une angine ulcéro-nécrotique voire un choc septique. Ces infections peuvent alors être bactériennes, fongiques et virales. Les patients peuvent présenter une fièvre et une infection grave et/ou récurrente.

Des symptômes liés à l'infiltration leucémique extra-médullaire sont présents dans environ 5% des cas, souvent au travers des manifestations cutanées. Un syndrome tumoral peut se déclencher mais reste variable en fonction des sous-types de LA. Dans le contexte du syndrome tumoral dans les LAM, une hypertrophie des organes hématopoïétiques (splénomégalie, hépatomégalie) et des douleurs osseuses (chlorome ou sarcome granulocytique) se déclenchent.

Il est indispensable de connaître les signes de gravité des LAM afin de les reconnaître et de pouvoir agir en urgence dès que la situation se présente.

Les signes de gravité sont une hyperleucocytose, un syndrome de leucostase (surtout dans les LA hyperleucocytaires (> 100 G/L)) avec l'apparition d'une détresse respiratoire, des troubles neurologiques/conscience, un syndrome de lyse tumorale (insuffisance rénale aigüe (IRA), hypocalcémie, hyperkaliémie) et enfin une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) qui est associée à certains sous-types de LAM. Cette CIVD survient chez un patient avec une insuffisance médullaire (CIVD à risque hémorragique) où le risque est majoré par l'introduction d'une chimiothérapie. En plus de ces manifestations cliniques, la LAM est accompagnée de manifestations biologiques avec un échappement aux processus apoptotiques par la surexpression de protéines anti-apoptotiques tel que B-cell leukemia 2 (Bcl2) et Nuclear protein 1(NCL-1)[62].

Cependant, il faut être conscient que la présence de cette symptomatologie est variable en fonction du patient, allant de la forme peu symptomatique à la forme grave d'emblée, nécessitant l'hospitalisation en urgence dans un service spécialisé.

f) Démarche diagnostique

L'étape de diagnostic est une étape cruciale dans la prise en charge de la maladie. Malgré ces symptômes, le diagnostic de la LAM est souvent inopiné puisqu'il s'agit d'une pathologie aiguë. Ainsi la découverte est le plus souvent fortuite ou découverte lors du suivi d'une autre hémopathie. La démarche diagnostique d'une LAM débute par une prise de sang périphérique ainsi qu'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 (NFS), d'une étude morphologique réalisée à partir d'un frottis médullaire, d'une étude cytochimique, et est éventuellement complété par un immunophénotypage, une étude cytogénétique et des études biomoléculaires. Chacune de ces techniques spécifiques sont présentées ci-dessous[70]. L'ensemble des informations obtenues au cours des examens permettent par la suite de déterminer le pronostic et de proposer une stratégie de traitement adaptée aux patients[71]. Il faut savoir que c'est une **urgence** de diagnostic et de traitement car une LA est rapidement mortelle.

1) *La Numération de la Formule Sanguine (NFS)*

En tout premier lieu, étant donné les signes cliniques, un hémogramme est réalisé afin d'évaluer la quantité et la qualité des cellules du sang tels que les hématies, les leucocytes et les plaquettes.

Effectuée à partir d'une prise de sang, la NFS permet de quantifier les différentes cellules sanguines et de détecter les anomalies présentes telles qu'une neutropénie, une anémie normocytaire arégénérative ou encore une thrombopénie. À l'hémogramme, une LAM pourra se présenter sous une forme hyperleucocytaire (blastose sanguine) ou au contraire pancytopénique (baisse du taux des différentes cellules sanguines dans le sang : Hématies, Leucocytes, Plaquettes). Ainsi, l'hémogramme participe à une visée diagnostique de la pathologie[72].

2) *Le myélogramme*

Le frottis médullaire est une technique indispensable pour confirmer le diagnostic de la LAM. C'est l'examen clé du diagnostic. Celui-ci est réalisé sous anesthésie locale, et consiste à insérer une aiguille creuse dans un os. Le choix du site de ponction dépend du contexte et du patient. En effet, il s'agit généralement d'une ponction sternale, cependant un antécédent de sternotomie ou un antécédent de radiothérapie localisée (cancer du sein, maladie de Hodgkin..) sont contre-indiqués avec une ponction au niveau du sternum ou d'une ponction iliaque. Lors de cette intervention, une petite quantité de moelle est aspirée, permettant d'analyser les cellules anormales, leurs chromosomes et leurs gènes. Ainsi, le myélogramme permet de quantifier et de répartir les différents précurseurs et de vérifier que soient respectées les différentes proportions de la lignée granulocytaire, et érythrocytaire de même que la pyramide de maturation. Il permet donc de prouver qu'on a une infiltration de la moelle par au moins 20% de blastes, ce qui est nécessaire afin de conclure à une LAM. Il permet également d'orienter vers le type de LA. Cette technique permet l'analyse morphologique des cellules hématopoïétiques issues de la MO. Ainsi le myélogramme est un examen indispensable permettant d'affirmer le diagnostic, de caractériser l'infiltrat blastique et d'orienter le type de LA par une étude cytomorphologique[73].

3) *L'étude cytochimique*

Les réactions cytochimiques sur frottis de moelle recherchent la présence d'une activité enzymatique myéloperoxydase (MPO) et d'une activité des estérases (certes de manière moins systématique pour ces dernières)[74].

- Cytochimie sur la myéloperoxydase (MPO)

La MPO est caractéristique de la lignée myéloïde et permet de poser le diagnostic différentiel entre LA myéloïde ou lymphoïde. En effet, une MPO positive, c'est-à-dire supérieure ou égale

à 3% de blastes positifs affirme le caractère myéloïde de la LA. Cependant**,** une MPO négative (< 3% de blastes positifs) n'exclut pas une LAM. À titre d'exemple, une MPO négative est présente dans les myéloblastes très peu différenciés et les mégacaryoblastes. En conséquence, si la MPO est négative, il sera nécessaire de réaliser un immunophénotypage comme examen complémentaire. La MPO est une enzyme spécifique des cellules myéloïdes, présente physiologiquement au niveau des granulations primaires des cellules granulocytaires et cellules monocytaires et participe à la fois à la défense immunitaire contre les pathogènes par son activité de peroxydation et à la résistance aux molécules de chimiothérapies dans les LAM. Le principe de cet examen se fonde sur l'oxydation de la benzidine en présence du peroxyde d'hydrogène produit par la myéloperoxydase cellulaire avec formation de grains vert-noir au May Grunwald Giemsa (MGG)[72].

- Cytochimie des estérases

En fonction de l'hypothèse proposée par l'examen morphologique, les cytochimies des estérases sont réalisées. Les réactions de l'estérase avec différents substrats facilitent la distinction entre les leucémies myéloblastes et monoblastes. Les estérases sont soit non spécifiques soit spécifiques.

- Estérase non spécifique (NASDA = Naphtol-ASD-Acétate) : L'enzyme hydrolyse le Naphtol-ASD-Acétate, ce qui produit de fins précipités bleus. Cette réaction entraîne une réaction très faible voire absente dans les myéloblastes et une positivité dans les monoblastes. Cette réaction a la particularité d'être inhibée en présence de fluorure de sodium. C'est cette inhibition qui la rend spécifique.
- Estérase spécifique (Butyrate estérase) : Cette coloration permet de reconnaître les cellules de la lignée monocytaire. L'enzyme butyrate estérase hydrolyse l'alpha naphtyl butyrate, ce qui produit une coloration rouge brun. Ainsi, ce marquage montre une positivité dans les cellules monocytaires notamment lorsque la différenciation monocytaire est évidente contrairement aux monoblastes.

4) *L'immunophénotypage*

Comme détaillé précédemment, l'immunophénotypage est surtout réalisé lorsqu'on est face à une MPO négative. En effet, celui-ci va ainsi permettre de différencier les LAM des LAL, de diagnostiquer les phénotypes mixtes et de confirmer le diagnostic de LAM, notamment certaines LAM indifférenciées (LAM 0) et rares (LAM 7). L'immunophénotypage est réalisé

par l'intermédiaire de la cytométrie en flux (CMF), qui permet de rechercher l'expression de marqueurs cellulaires et cytoplasmiques de différenciation des cellules sanguines ou de la MO. Cette quantification est fondée sur l'expression de marqueurs spécifiques de chacun des types cellulaires, mis en évidence par des anticorps fluorescents de couleurs différentes :

- Les marqueurs d'immaturité (Human Leukocyte Antigen – DR isotype (HLA-DR), CD34, CD38) ;
- Les marqueurs de la lignée myéloïde (MPO, CD11b, CD13, CD14, CD15, CD33, CD65, CD117) ;
- Les marqueurs de la lignée lymphoïde B (CD10, CD19, CD20, CD22) ;
- Les marqueurs de la lignée lymphoïde T (CD2, CD3, CD4, CD5, CD7) ;
- Les marqueurs associés aux cellules Natural Killer (NK) (CD56).

Cependant, afin d'étudier les anomalies phénotypiques rencontrées dans les LAM, il est nécessaire de connaître la maturation normale des différentes lignées médullaires. Pour cela, il existe des courbes de maturation des lignées granulocytaires, monocytaires et érythroblastiques avec modulation de l'expression antigénique au cours de la maturation (Figure 11). Les cellules leucémiques montrent un profil différent d'une cellule normale au cours de la maturation. Cependant, il persiste des analogies avec le profil de maturation d'une cellule normale, permettant de définir le stade de maturation auquel la cellule s'est arrêtée, mais on peut observer différents types d'anomalies permettant de distinguer une cellule blastique normale, d'une leucémique[75].

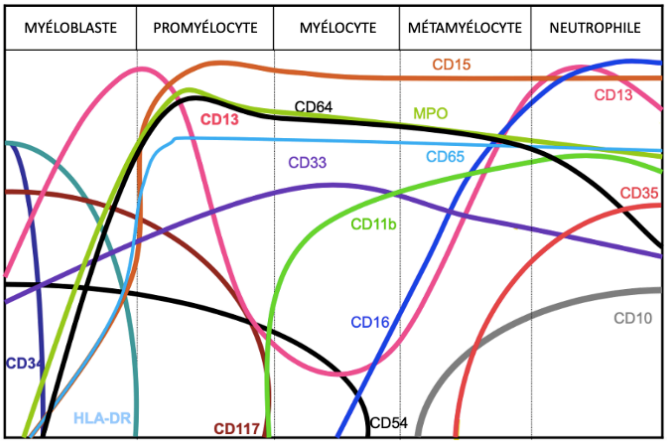

Figure 11: Schéma de l'expression des antigènes pendant la différenciation neutrophile, *adaptée de A. ORfao, EJNet Flow MDS, Amsterdam* (MPO, Myéloperoxydase)

3 types d'anomalies sont possibles d'être retrouvés :

- L'absence d'expression de marqueurs présents normalement à un stade de maturation donné pour la lignée dont est issue la cellule leucémique ;
- Le niveau d'expression anormale d'un marqueur présent pour un stade de maturation donné ;
- L'expression de marqueurs d'autres lignées non exprimées normalement par les cellules de la lignée dont sont issues les cellules leucémiques.

Cet examen permet ainsi une caractérisation phénotypique de la LA en confirmant l'appartenance à la lignée myéloïde et l'état de différenciation des cellules leucémiques. En effet, on sélectionne la population blastique de cellules tumorales parmi les autres, en utilisant la faible expression du CD45 des blastes. Ainsi, l'objectif de l'immunophénotypage est d'identifier la lignée cellulaire en cause, d'identifier le stade de maturation, d'identifier une éventuelle LA biphénotypique (avec l'expression aberrante d'un marqueur), de rechercher les antigènes de maturité (CD34, HLA-DR), de caractériser une LA MPO négative et de faire un suivi de la maladie résiduelle. L'immunophénotypage, se base sur un score, qui est accordé en fonction du type de marqueur exprimé par la cellule, où les antigènes les plus spécifiques auront le score le plus élevé (Figure 12). Ainsi, pour poser le diagnostic, il faut avoir l'expression des antigènes spécifiques et la non-expression des antigènes des autres lignées[76].

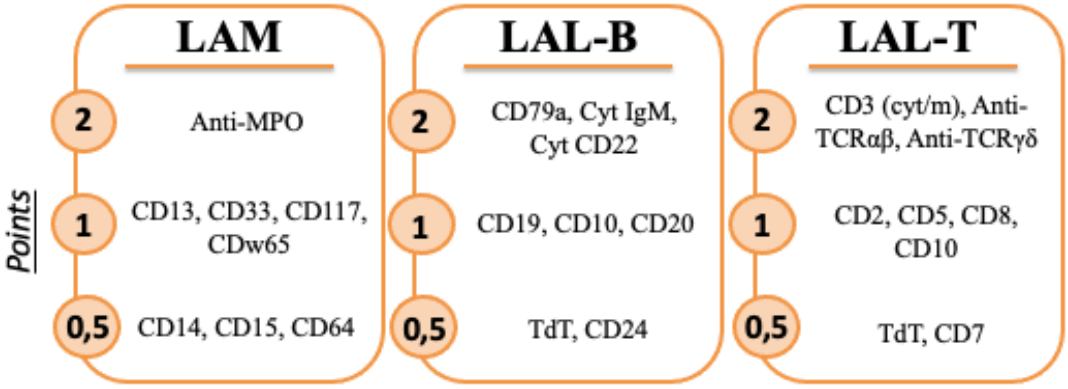

Figure 12: Score de l'European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL), permettant de caractériser les LA (LAM, Leucémie aiguë myéloïde ; LAL, Leucémie aiguë lymphoïde ; MPO, Myéloperoxydase ; TCR, Récepteur des lymphocytes T ; TdT, Terminal déoxy-nucléotidyl-transférase)

Donc pour l'immunophénotypage des LAM, on se base sur l'expression anti-MPO tout d'abord, puis sur la présence de plusieurs antigènes myéloïdes comme CD33, CD13 ou CD117. Plus précisément, on peut évaluer le sous-type de LAM par cytométrie en recherchant l'expression de certains marqueurs de surface.

5) *La cytogénétique*

Cette technique se base sur une analyse des cellules en mitose (caryotype) ou non (FISH) pour la recherche d'anomalies à l'échelle des chromosomes. La technique conventionnelle est le **Caryotype +/- FISH** (Fluorescent in situ hybridization). Cette analyse permet d'observer les anomalies caryotypiques de nombre ou de structure (insertion, délétion, translocation) par marquage de portions de chromosome avec des sondes fluorescentes apportant un intérêt diagnostique (si présence indépendamment du pourcentage de blastes) et un intérêt pronostique. En effet, cette technique permet ainsi de participer à la classification des différents types de LAM puisque certaines anomalies caryotypiques constituent un facteur pronostique indépendant des autres facteurs de risque :

- Résultats Favorables : pour les LAM avec des translocations t(8;21), t(15;17) et inversions ou translocations du chromosome 16, inv(16) / t(16;16) ;
- Résultats Défavorables : pour les LAM avec délétion du bras long du chromosome 5 del(5q), réarrangement de la région 11q23 et caryotypes complexes[77].

6) *La biologie moléculaire*

La biologie moléculaire a un intérêt diagnostique, pronostique mais également dans le suivi de la maladie. Elle se fonde sur des études de transcrits de fusions récurrentes, de mutation génique et de suivi par réaction en chaîne par polymérase de transcription inverse (RT-PCR) des mutations pour recherche d'anomalies au niveau de l'ADN notamment. On peut y retrouver des gènes impliqués dans la méthylation, dans l'activation de la signalisation (JAK2, FLT3, KIT), dans les suppresseurs de tumeur (TP53, WT1), facteur de transcription (NMP1), maturation d'ARN, régulateurs épigénétiques (ASXL1). Environ 40% des LAM ont des caryotypes normaux. En conséquence, l'identification de ces anomalies moléculaires est indispensable et permet d'avoir une vue d'ensemble d'anomalies génétiques propres aux patients, ce qui participe à la stratification des patients, impactant la prise en charge thérapeutique[66,78].

7) *Les autres examens biologiques*

Dans le contexte de la démarche diagnostique, des examens biologiques complémentaires sont effectués :

- Un bilan rénal, un ionogramme, un bilan hépatique, un bilan d'hémostase (CIVD) ;
- Une échographie cardiaque ;
- Les sérologies virales EBV, VIH, CMV, VHB, VHC ;

- Le typage des antigènes d'histocompatibilité (HLA) du patient (et de la fratrie si projet d'allogreffe).

g) Classifications

Une fois la démarche diagnostique réalisée, il est possible de statuer sur la pathologie et de classifier la LAM (sous-type), ce qui permet de mettre en place la prise en charge du patient. Les LAM regroupent un ensemble d'entités très hétérogènes nécessitant la mise en place d'une classification consensus. Trois classifications sont utilisées pour définir le sous type de LAM : la classification FAB (Franco-américano-britannique), la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et la plus récente, la classification ELN (European Leukemia Net).

1) *Classification Franco-américano-britannique (FAB)*

Le blocage de la différenciation des précurseurs des cellules myéloïdes peut toucher l'ensemble de cette lignée. Les différents stades de blocage ont ainsi été regroupés au sein de la classification FAB, reposant sur des caractéristiques principalement morphologiques et cytochimiques des cellules leucémiques (Figure 13). La diversité des stades de blocages dans l'hématopoïèse myéloïde constitue le premier niveau de complexité des LAM[79,80].

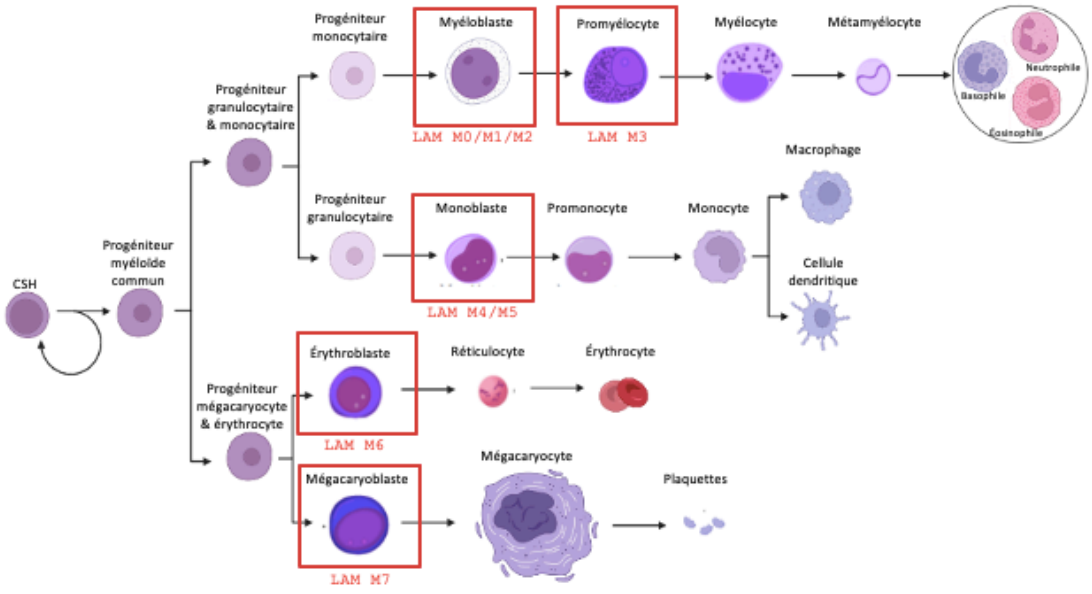

Figure 13: Schéma de l'hématopoïèse et des différents sous-types de LAM associés au blocage dans la différenciation hématopoïétique, *d'après Krause Daniela S., et al.*[76]

Cette classification a été établie en 1976 par un groupe coopérateur franco-américano-britannique puis révisée en 1985. Jusqu'en 2017, cette classification était en vigueur, permettant

d'une part de distinguer les LAM des LAL et d'autre part de classer la LAM en sous-types suivant leurs critères morphologiques et cytochimiques. Ainsi, 8 sous-types de LAM peuvent être distingués, allant de M0 à M7 selon leur appartenance à une lignée cellulaire et au stade de maturation (Figure 14)[81–83].

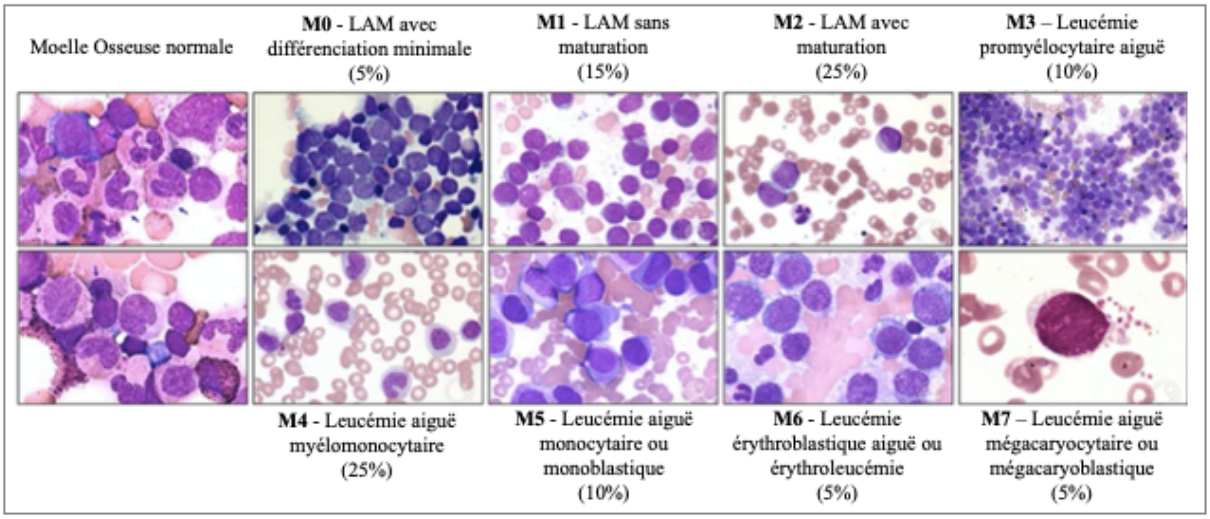

Figure 14: Les différents types cytologiques (coloration May-Grundwald-Giemsa) **de LAM selon l'ancienne classification FAB,** *(source ASH Image Bank)*

2) *Classification de l'Organisation mondiale de la santé (OMS)*

Cette classification a été élaborée en 2001 et révisée en 2008 et 2016. L'OMS a développé une nouvelle classification en y intégrant les caractéristiques cytogénétiques, moléculaires ainsi que les antécédents pathologiques et thérapeutiques des patients (Tableau 1). C'est donc un système qui prend en compte les caractéristiques de la cellule d'une part et de la génétique d'autre part pour classer la LAM. Cette classification vient donc compléter les critères de la classification FAB. L'avantage est le caractère pronostique en termes d'évolution et de réponse au traitement. Grâce aux progrès de la cytogénétique et à une meilleure compréhension des mécanismes de leucémogénèse, la classification n'a cessé d'évoluer et de s'affiner, d'où la révision en 2016. Cette révision fait part de la reconnaissance des LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes et entités provisoires avec mutations des gènes NPM1 et CEBPA[84].

Tableau 1: Classification des LAM selon l'Organisation Mondiale de la Santé

Types	Sous-types
LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes *(30% des LAM)*	-t(8;21)(q22;q22.1) ; RUNX-RUNX1T1 -inv(16)(p13.1q22) ou ((16;16)(p13.1;q22) ; CBFB-MYH11 LAP avec PML-RARA -t(9;11)(p21.3;q23.3) ; MLLT3-KMT2A -t(6;9)(p23;q34.1) ; DEK-NUP214 -inv(3)(q21.3;q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2) ; GATA2,MECOM(EVI1) -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 *(10% des LAM)*	
LAM secondaire à une chimiothérapie *(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 *(50% 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	

3) *Classification European Leukemia Net (ELN)*

Les progrès scientifiques dans le domaine de la biologie moléculaire en plus d'avoir impacté la prise en charge thérapeutique des patients, ont permis le développement d'une nouvelle classification des LAM. En effet, l'étude des anomalies moléculaires sur d'importantes cohortes de patients a permis le développement d'une classification prédictive de l'évolution des LAM, connue comme la classification ELN. En effet, cette classification a permis d'affiner les sous-groupes pronostiques en reprenant les données de l'OMS et en y ajoutant des sous-groupes basés sur les mutations des gènes FLT3, NPM1 et CEBPA. Les éditions 2010 et 2017 des recommandations de l'ELN pour le diagnostic et la prise en charge de la LAM chez l'adulte sont largement reconnues par les médecins et les chercheurs[82]. Cependant, depuis 2017, il y a eu des avancées majeures dans notre compréhension de la LAM, y compris de nouvelles connaissances sur la pathogenèse moléculaire, conduisant à une mise à jour de la classification

de la maladie, des progrès technologiques dans le diagnostic génomique et l'évaluation de la maladie résiduelle mesurable, et le développement réussi de nouveaux agents thérapeutiques, comme les inhibiteurs de FLT3, IDH1, IDH2 et Bcl2 [16,57,85]. Ces progrès ont incité à la mise à jour de l'ELN en 2022, qui comprend une classification révisée des risques génétiques ELN, des critères de réponse révisés et des recommandations de traitement. Les recommandations de l'ELN ont déterminé des profils de mutations pour fournir des informations pronostiques et permettre la stratification des patients en 3 catégories de risques, c'est-à-dire, un groupe favorable, intermédiaire et défavorable (Tableau 2)[86]. De ce fait, cette classification repose sur les anomalies cytogénétiques ou moléculaires retrouvées au diagnostic des hémopathies malignes.

Tableau 2: Classification pronostique des LAM basée sur les données génétiques selon l'ELN 2022

Catégorie de risque	Anomalies cytogénétiques
Favorable	-t(8;21)(q22;q22.1) ; RUNX-RUNX1T1 -inv(16)(p13.1q22) ou ((16;16)(p13.1;q22) ; CBFB-MYH11 -Mutation NPM1 sans FLT3-ITD ou avec FLT3-ITDlow -Mutation bi-allélique CEBPA
Intermédiaire	-Mutation NPM1 et FLT3-ITDhigh -Sauvage NPM1 sans FLT3-ITD ou avec FLT3-ITDlow -t(9;11)(p21.3;q23.3) ; MLLT3-KMT2A -Anomalies cytogénétiques non classifiées dans favorable ou défavorable
Défavorable	-t(6;9)(p23;q34.1) ; DEK-NUP214 -t(v;11q23.3) ; KMT2A réarrangé -t(9;22)(q34.1;q11.2) ; BCR-abl1 -t(8,16)(p11;p13) ; KAT6A-CREBBP -inv(3)(q21.3;q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2) ; GATA2,MECOM(EVI1) -t(3q26.2;v) ; MECOM(EVI1) réarrangé --5 ou del(5q) ; -7 ; -17/abn(17p) -Caryotype complexe ; Caryotype monosomal -Mutation ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1 OU ZRSR2 -Mutation TP53

Ces recommandations ELN pour la prise en charge des LAM proposent de nouveaux critères d'évaluation de réponse au traitement et prennent en compte l'évaluation de la maladie résiduelle. Actuellement l'ELN permet depuis plusieurs années d'orienter les cliniciens vers les choix thérapeutiques les plus efficaces pour soigner les patients atteints de LAM.

h) Prise en charge

La prise en charge dépend donc en partie de la classification de la LAM. Il faut savoir que la LAM est une urgence de traitement, car une LA est rapidement mortelle en absence de

traitement, à cause de l'insuffisance médullaire et du syndrome tumoral. Ainsi, dans ce cadre, lorsque le patient est diagnostiqué atteint de LAM, le dispositif d'information du patient peut être adapté avec dans un premier temps, l'annonce de l'urgence de la situation et la mise en route du traitement, puis dans un second temps l'annonce du diagnostic précis avec l'intégralité des résultats biologiques complets et l'avis rendu en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP). Il est évident, qu'avant tout traitement, les patients sont informés des bénéfices attendus et des effets indésirables potentiels des thérapeutiques disponibles dans leurs situations ainsi que de l'intérêt de participer à un essai clinique.

Cependant, la prise en charge des LAM présente des obstacles : le risque infectieux, le risque d'échec de rémission, le risque de rechute. C'est pourquoi, il faut qu'elle soit adaptée au patient. Ainsi, la prise en charge des patients atteints de LAM dépend de la classification de la LAM. Mais elle peut être également guidée par divers facteurs classés en deux groupes, soit les facteurs liés au patient soit les facteurs liés à la pathologie. Une partie du traitement de la LAM dépend de l'état général du patient. En effet, comme dit précédemment, l'âge est un facteur important dans la prise en charge des LAM. Il est fréquent que les patients âgés de plus de 60 ans ne bénéficient pas du même traitement que les patients plus jeunes et ce notamment dû à leurs comorbidités (polypathologie, polymédication,…)[87].

Le traitement de la LAM est complexe et évolutif, donc il est préférable qu'il soit pratiqué dans le centre le plus spécialisé disponible, en particulier lors des phases critiques (*exemple :* induction de la rémission) et notamment en chambre stérile puisque les traitements induisent une phase d'aplasie où le risque infectieux et hémorragique est important.

1) *Données historiques*

Au 19ème siècle, les traitements utilisés étaient purement palliatifs, combinant fortifiants et analgésiques. Les travaux de *Karl Landsteiner* en 1905 ont permis la découverte des groupes sanguins entraînant l'utilisation progressive des transfusions pour lutter contre l'anémie et les hémorragies dans les LA. À la suite de la mise évidence de l'action inhibitrice de la Colchicine sur les mitoses végétales, celle-ci fut une des premières thérapeutiques utilisées dans la LAM, via des injections intramédullaires. L'efficacité a certes été remise en cause, mais les résultats transitoires étaient impressionnants pour des premiers essais d'exsanguino-transfusion, par *Marcel Bessis* et *Jean Bernard*, entraînant des premières rémissions de LA. Cependant, les rechutes étaient systématiques. À la même époque, outre-Atlantique, les débuts de la chimiothérapie des LA commençaient avec *Sidney Farber* et ses collaborateurs, qui

annoncèrent en juin 1948 des rémissions temporaires pour 16 enfants traités avec de l'Aminoptérine, un antagoniste de l'Acide folique[88].

Par la suite d'autres anti-foliques ont été testés notamment l'Améthoptérine, jugé plus efficace et moins toxique par voie orale, commercialisé sous le nom de Méthotrexate®, devenu actuellement l'anti-folique de référence. Par la suite, l'association anti-folique/Cortisone a été remplacée par l'association 6-Mercaptopurine / Améthoptérine / Cortisone, considérée en 1964 comme le meilleur traitement disponible.

2) *Objectif thérapeutique*

L'objectif thérapeutique des traitements des LAM est de maintenir le plus longtemps possible des patients en phase de rémission. Pour ce faire, il faut d'abord réduire la charge blastique à l'aide d'agent cytotoxique puis il sera alors envisageable de greffer ces patients afin de favoriser la récupération hématopoïétique (Figure 15)[89,90].

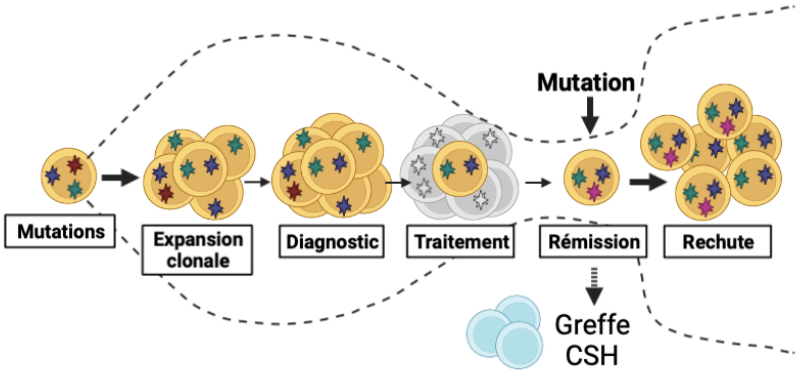

Figure 15: Schéma de l'itinéraire des cellules mutées au traitement, *d'après Garg, Manoj, et al.*[90]

Cependant une greffe de CSH n'est pas envisageable pour l'ensemble des patients et ce notamment car les greffes induisent une immunosuppression avancée que les patients les plus fragiles ne sont pas à même de supporter. En effet, la prise en charge de la LAM dépend de l'aptitude médicale de l'individu. Différentes options thérapeutiques alternatives ont donc été développées afin de garantir la prise en charge des patients ne pouvant bénéficier d'une greffe (Figure 16). Afin d'amener les patients jusqu'à cette étape cible de rémission, différents traitements peuvent intervenir avec d'une part, les traitements conventionnels et d'autre part, les nouvelles thérapies comprenant les thérapies ciblées.

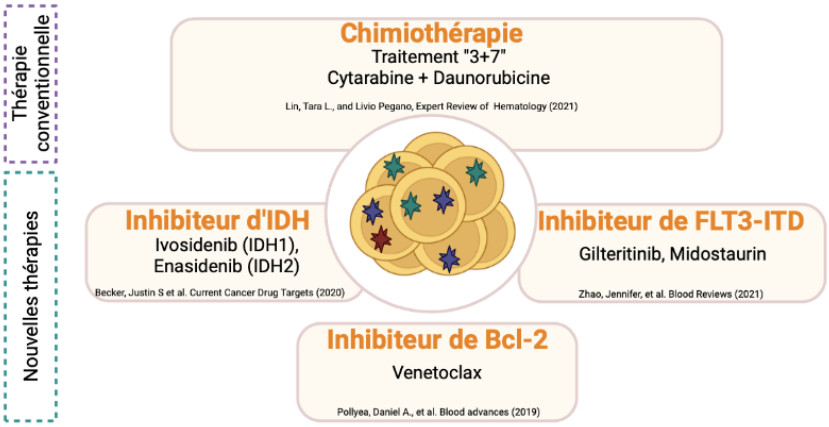

Figure 16: Schéma des différentes thérapeutiques dans la LAM

3) *Thérapies conventionnelles*

La thérapie conventionnelle repose principalement sur la chimiothérapie. La survie des patients âgés traités par une chimiothérapie standard est habituellement meilleure que par chimiothérapie à faible dose[91,92].

La décision de traiter ou non de façon intensive est donc très importante et ne dépend pas seulement de l'âge mais surtout des comorbidités du patient en plus de la classification pronostique.

1) Induction

Chez les patients en bon état général, le traitement initial consiste en une chimiothérapie d'induction visant à induire une rémission complète. En onco-hématologie, un patient est considéré *« fit »* s'il est un candidat à la chimiothérapie, sinon on le désigne comme *« unfit »*. Les patients en rémission reçoivent ensuite un traitement de consolidation pouvant comprendre une greffe allogénique de CSH. La rémission complète est définie par une présence inférieure à 5% de blastes dans la MO, une récupération d'une numération plaquettaire (>100.10^9/L) et des neutrophiles (>1.10^9/L) sans signe de LAM extra médullaire.

La phase d'induction consiste en un traitement dit de « 3+7 », c'est-à-dire qu'il comprend l'association d'un antimétabolite tel que la Cytarabine (100-200 mg/m^2), en perfusion intraveineuse (IV) continue pendant 7 jours, et d'une anthracycline, tel que la Daunorubicine (≥60 mg/m^2), administrée par voie IV pendant 3 jours au cours de la même période. Ce traitement se traduit généralement par une aplasie profonde qui persiste environ 4 semaines, avec des risques d'infections et d'hémorragies. C'est pourquoi pendant cette période, des mesures préventives et des soins de support sont vitaux. Les taux de rémission complète sous *« 3+7 »* sont d'environ 60-85% des patients de moins de 60 ans avec une génétique assez

favorable. Contrairement aux patients plus âgés, où seuls 45-60% des patients obtiennent la rémission complète[93–95].

A. Anthracyclines

Ces molécules ont d'abord été décrites comme des intercalants, puis leurs activités sur les topoisomérases II ont été mises en évidence[96–99]. En effet, la topoisomérase de type II coupe les 2 brins d'un segment d'ADN, permettant ainsi le passage d'un autre segment du double brin. Les anthracyclines, telles que la Daunorubicine et la Doxorubicine sont des inhibiteurs de la topoisomérase II. Les anthracyclines possèdent une structure caractéristique avec une quinone et une osamine, groupement important pour l'activité inhibitrice de topoisomérase II (Figure 17).

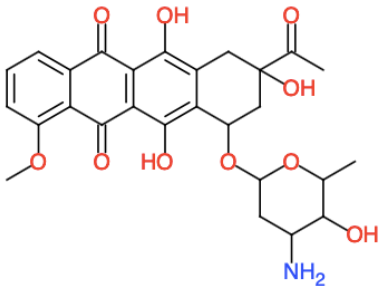

Figure 17: Structure chimique de la Daunorubicine

Ces composés sont rouges à pH acide, bleus à pH alcalin, cela permet de les caractériser. Leur couleur, généralement rouge dans les conditions habituelles explique une coloration possible des urines en rouge, qui peut inquiéter le patient. D'ailleurs, la dose de Daunorubicine est passée de 45 mg/m^2 à 90 mg/m^2 devant l'augmentation significative des taux de rémission complète et de la survie globale sans augmentation de la toxicité[100,101].

En 2018, il a été démontré dans l'essai randomisé SAL-DaunoDouble que la dose de daunorubicine à 60 mg/m^2 était aussi efficace qu'à 90 mg/m^2, et de ce fait de nombreux centres en France utilisent cette dose en induction.

B. Antimétabolites

La spongouridine, issue de l'éponge Tethya crypta, qui a inspiré la cytarabine (Aracytine®), est souvent présentée comme le 1er médicament issu de l'étude des produits marins. Les antimétabolites sont des médicaments agissant sur la biosynthèse de l'ADN en interférant avec la synthèse des acides nucléiques qui constituent l'ADN. Ils vont agir de façon prépondérante sur la phase S, ce qui inhibe la prolifération des cellules. La cytarabine ou cytosine arabinoside (Ara-C) est un analogue de la cytosine, nucléosides pyrimidiques. En effet, ils ressemblent à la

cytosine par isostérie où la partie sucre et non la base est modifiée (le ribose est remplacé par l'arabinose) (Figure 18)[102].

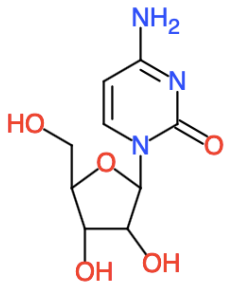

Figure 18: Structure chimique de la Cytarabine

Plusieurs mécanismes de résistance cellulaire aux médicaments ont été décrits chez les patients atteints de LAM. Le plus largement étudié est le phénotype MDR (Multidrug resistance) associé à la surexpression des pompes d'efflux transmembranaires, telles que Glycoprotéine P (P-gp)[103]. Chez les patients atteints de LAM traités par des schémas thérapeutiques standards associant anthracyclines et Ara-C, la surexpression de P-gp est associée à des taux de rémission complète plus faibles et à une survie globale plus courte[104]. Cependant, d'autres mécanismes liés à la résistance à l'Ara-C peuvent être impliqués.

Farge et al., ont d'ailleurs mené une étude afin de connaître l'enrichissement des cellules de LAM humaine résistantes à la chimiothérapie. Pour y répondre, ils ont développé une approche chimiothérapeutique traitant les xénogreffes dérivées de patients (PDX) avec de la cytarabine. Les cellules préexistantes et persistantes résistantes à l'AraC présentaient des niveaux élevés d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), montraient une augmentation de la masse mitochondriale et conservaient des mitochondries polarisées actives, ce qui correspond à un statut de phosphorylation oxydative (OxPhos) élevée. Ainsi, les cellules LAM avec un phénotype énergétique élevé OxPhos sont nettement moins sensibles à la chimiothérapie AraC par rapport aux cellules LAM faiblement OxPhos chez les souris immunoéficientes dites NSG (NOD/SCID/IL2Rγ-/-). Il a également été montré que la modulation du statut OxPhos mitochondrial a affecté l'effet de l'AraC *in vitro* et *in vivo*. En effet, ces travaux ont 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 (ADNmt) ou encore la synthèse de protéines mitochondriales permettait de restaurer la sensibilité à la cytarabine *in vitro* ainsi qu'*in vivo*.

2) Consolidation

La première étape du traitement se poursuit avec une phase de consolidation. L'objectif principal de l'étape de consolidation est d'éliminer les cellules leucémiques résiduelles qui persisteraient malgré l'obtention d'une rémission complète après le traitement d'induction, pour prévenir une rechute. Cette étape est réalisée par chimiothérapie ou greffe de CSH. Le choix du traitement dépend du risque de rechute de la leucémie, de l'âge du patient, des comorbidités existantes, ainsi que de la disponibilité d'un donneur approprié pour la greffe. De cette manière, le traitement de consolidation habituel repose sur 2 à 4 cycles de Cytarabine à forte dose, suivis ou non d'une greffe de CSH[94].

4) *Allogreffe*

L'objectif d'une greffe, plus précisément de CSH, est de reconstituer le système hématopoïétique chez un patient ayant reçu un traitement myéloablatif, par injection de CSH. Dans le cas d'une LAM, une allogreffe de CSH d'un donneur sain est possible afin de remplacer les CSH malades par des CSH saines issues d'un donneur (Figure 19). Cependant, afin d'en bénéficier, il faut répondre à certains critères d'éligibilité comme l'âge et le bon état de santé générale, puisqu'avant la greffe, il y a une étape de conditionnement pré-greffe afin de vider la niche hématopoïétique, d'éliminer les cellules tumorales et d'entraîner une immunosuppression. Pour sa réalisation, le patient va être placé en aplasie médullaire pour détruire son système immunitaire et ensuite lui administrer des CS qui vont rejoindre la MO grâce au phénomène de « homing » et une fois dans la MO, celles-ci vont s'auto-renouveler et se différencier, permettant la reconstitution du système hématopoïétique. Ce traitement est indiqué dans le cadre d'hémopathies touchant les CSH, comme les maladies malignes (LAM, LAL, LMC, LLC, Myélome multiple, SMD) et les maladies non malignes (Drépanocytoses, aplasies médullaires).

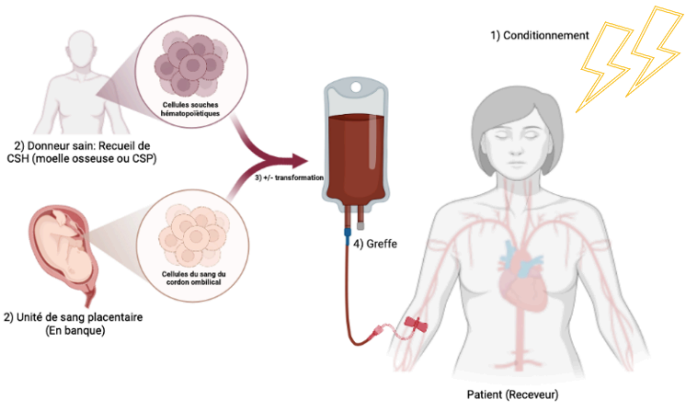

Figure 19: Déroulement d'une allogreffe

Le patient va tout d'abord subir une étape de conditionnement (J-9), c'est-à-dire une chimiothérapie à haute dose et/ou associée à de l'irradiation corporelle totale et parfois des immunosuppresseurs, afin d'administrer un traitement myéloablatif ou « atténué » au patient. L'objectif de ce conditionnement pré-greffe est de vider les niches hématopoïétiques, d'éliminer les cellules tumorales et d'engendrer une immunosuppression. A J0, le patient va subir une greffe (après recueil du greffon et d'une +/- transformation). L'allogreffe peut être réalisée à partir de différents types de greffon, comme la MO (457 greffes/an), le sang périphérique (1433 greffes/an) ou le sang placentaire (74 greffes/an). Ainsi la source principalement utilisée en allogénique est le sang périphérique mais il faut être conscient, que chaque source a des avantages et inconvénients (Tableau 3)[105–107].

Tableau 3: Les différents types de greffon de l'allogreffe

Moelle Osseuse	AVANTAGES	○ Prélèvement le jour même de la greffe
	INCONVENIENTS	○ Ponction des crêtes iliaques postérieures sous anesthésie générale ➔ hospitalisation du donneur
Cellules souches périphériques	AVANTAGES	○ Prélèvement par cytaphérèse ○ 4 à 10 fois plus riche que la MO ○ Sortie d'aplasie plus précoce
	INCONVENIENTS	○ Faible fréquence des CSH dans le sang périphérique (0.04%) : nécessité d'une mobilisation à l'aide du G-CSF recombinant, facteur de croissance de la lignée granuleuse, qui permet de cliver l'interaction de la CSH avec le stroma de la MO. Effet du G-CSF chez le donneur ? ○ Riche en lymphocytes : risque accru de GVHD
Sang placentaire	AVANTAGES	○ Ponction dans la veine ombilicale après clampage du cordon ombilical lors de l'accouchement : prélèvement facile et sans douleur ○ Disponibilité (grand nombre de donneurs, temps de recherche plus court, pas de refus de dernière minute) ○ Immaturité lymphocytaire : moins de GVHD ○ Moindre exigence sur la compatibilité
	INCONVENIENTS	○ Faible richesse cellulaire ○ Prise plus lente ○ Reconstitution immunitaire lente avec risques infectieux

En conclusion, le mode d'action de la greffe de CSH est d'associer un effet cytotoxique du conditionnement et un effet allogénique immunologique du greffon contre la maladie : effet GVL. Cet effet a pour objectif que le greffon, plus précisément les lymphocytes T du donneur, reconnaissent les cellules du patient comme du non-soi, entraînant une attaque de celles-ci. Cependant, ce type de thérapie présente des complications importantes, c'est pourquoi tous les patients ne sont pas sujets à des allogreffes. En effet, lors du déroulement d'une allogreffe, il y a des risques dus au conditionnement (Toxicité, infections, alimentation parentérale,...), et dus à la greffe (Immunosuppression, effet de la greffe contre l'hôte (GVHD), Rejet, Rechute).
Cette dernière est recommandée pour les patients répondant mal à la chimiothérapie seule ou ayant un profil de risque intermédiaire ou défavorable. Chez les patients âgés qui ne peuvent supporter les traitements intensifs (patients *« unfit »*), l'utilisation d'agents hypométhylants, comme la Décitabine ou Azacitidine, est recommandée (ce qui permet d'améliorer leur survie et leur qualité de vie). Ces agents déméthylants sont des substances chimiques qui peuvent inhiber la méthylation, entraînant l'expression des gènes précédemment hyperméthylés silencieux. Les 2 chefs de file de cette classe sont 2 analogues nucléosidiques de la cytidine : la 5-azacytidine (Azacitidine) et la 5-azadésoxycytidine (Décitabine), qui inhibent les ADN méthyltransférases[108,109].

5) *Prise en charge des signes cliniques*

En plus de cette stratégie thérapeutique, il est nécessaire de prendre en charge les signes de gravité de la LAM donc il faut mettre en place :

- **Une prévention du syndrome de lyse cellulaire** avec une hyper-diurèse alcaline et Rasburicase, un agent uricolytique puissant qui catalyse l'oxydation enzymatique de l'acide urique en allantoïne ;
- **Une chimiothérapie cytoréductrice** et dexéthasone ou leucaphérèse contre la leucostase ; La prescription d'hydroxyurée (HYDREA®) permet généralement de faire rapidement la leucocytose sans majorer le syndrome de lyse tumorale de façon importante.
- **Une correction du syndrome d'insuffisance médullaire** (symptomatique).
    - Transfusions de culots globulaires phénotypés, déleucocytés, irradiés pour compenser une anémie ;
    - Transfusions d'un concentré de plaquettes pour compenser une thrombopénie ;
    - Antibiothérapie IV probabiliste à spectre large pour compenser une agranulocytose.

6) *Rechute : Mutation, Maladie résiduelle, Dormance cellulaire / Maladie réfractaire*

Il faut cependant savoir qu'il y a une forte proportion de rechute post-chimiothérapie, ainsi que des patients non répondeurs au traitement. En effet, en dépit des progrès thérapeutiques, les LAM restent des affections de très mauvais pronostic avec un taux de survie sur 5 ans des patients faibles de 30,5% sur la période 2012-2018[49,50]. La rechute équivaut à une preuve de progression de la maladie chez un patient, qui a précédemment atteint les critères de rémission complète ou partielle sur une période supérieure ou égale à 6 mois. Les rechutes peuvent avoir différentes origines : soit la sous-population clonale majoritaire au diagnostic a subi de nouvelles mutations, soit une sous-population clonale résistante à la chimiothérapie initiale a émergé (équivaut à une maladie résiduelle), soit la rechute est liée à une dormance cellulaire (Figure 20). Le concept de maladie résiduelle se définit comme la présence de cellules blastiques résiduelles chimiorésistantes chez les patients en rémission complète, qui sera alors à l'origine des rechutes. Une rechute peut se faire également par le réveil de cellules jusqu'alors en latence, et ce concept se nomme « la dormance tumorale »[110,111].

Il y a donc une nécessité d'agir afin de réduire ces phénomènes de rechute. En revanche, la maladie réfractaire est définie soit comme un échec du traitement soit comme une progression de la maladie dans les 6 mois suivant la dernière dose de traitement.

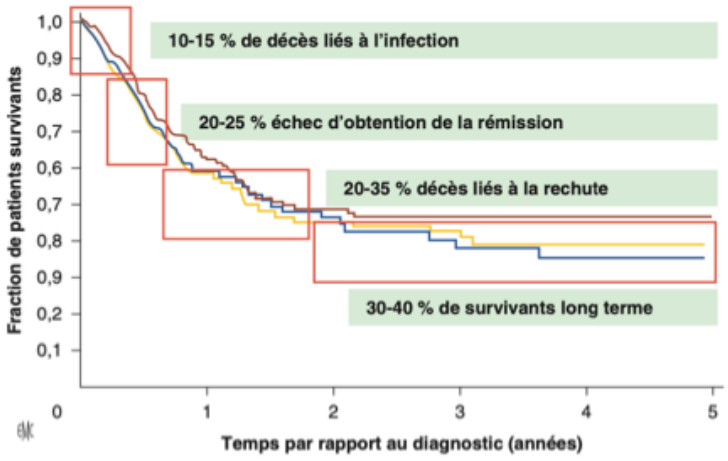

Figure 20: Schéma des problématiques du traitement des LAM[112]

Il y a donc une nécessité d'améliorer la prise en charge du patient atteint de LAM afin de limiter ce phénomène de rechute.

7) *Innovations thérapeutiques*

Classiquement la prise en charge des patients atteints de LAM repose donc sur l'interprétation de données cliniques et biologiques du patient, qui mènera le clinicien à mettre en place la plupart du temps une chimiothérapie. Précédemment, la prise en charge était fondée sur le concept de traiter le cancer en fonction de l'organe. Par conséquent, pour un type de cancer et un stade de la maladie, des traitements uniformes s'appliquaient aux patients, pour être dans une approche dite « *One-size-fits-all approach* », c'est-à-dire « thérapie universelle ». Cependant, cette approche présente des limites. En effet, prescrire une unique molécule pour traiter le cancer est une réelle source de résistances tumorales, entraînant une diminution de l'efficacité des médicaments, des problèmes de toxicité et d'implications fonctionnelles à long terme[1].

Aujourd'hui, le diagnostic et la prise en charge des hémopathies malignes reposent principalement sur les caractéristiques cytogénétiques et moléculaires des blastes leucémiques. Ces approches ont ainsi permis l'émergence de nouvelles cibles et ont ouvert la possibilité de proposer des thérapies ciblées en fonction du profil génomique unique du patient[113,114]. Ainsi, de nombreuses thérapies ont émergé ces 10 dernières années, approuvées depuis 2017 par différents organismes de santé tels que la FDA, l'agence européenne des médicaments (EMA) (Figure 21).

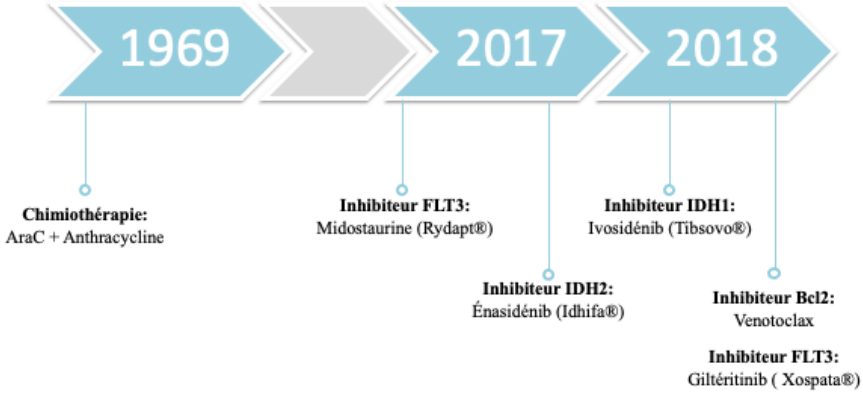

Figure 21: Nouveaux traitements approuvés par la FDA et l'EMA

i. Inhibiteur de Bcl2

L'apoptose est une mort cellulaire programmée afin d'éliminer les cellules indésirables. Pour cela, l'apoptose via la voie mitochondriale induit la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MME), qui permet la libération du cytochrome C (CytC). Une fois libéré, le CytC forme l'apoptosome avec la protéine Apaf1, qui va alors activer la caspase 9. La

famille de protéine Bcl2 régule l'apoptose en contrôlant la perméabilité mitochondriale. Des protéines activatrices de l'apoptose sont présentes dans cette famille de Bcl2 tels que Bax, Bak et Bim. En effet, l'activation de Bax et Bak entraine la déstabilisation de la MME, qui est suivie de la libération du CytC. L'activation de Bax et Bak est directement réalisée par les protéines BH3-only. Celles-ci se fixent directement sur Bax et Bak. Des dépresseurs (Mcl-1, Bcl2) sont également présents, neutralisant l'apoptose en maintenant les protéines pro-apoptotiques (Bak, Bax) sous forme inactive. Ainsi, l'oncoprotéine Bcl-2 joue un rôle majeur dans le contrôle de l'apoptose. La surexpression de Bcl-2 permet aux cellules cancéreuses d'échapper à l'apoptose via la séquestration des protéines pro-apoptotiques. Des études ont mis en évidence que l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 est augmentée dans les LAM[115].

Cette surexpression est associée à une résistance à la chimiothérapie conventionnelle. C'est pourquoi, il parait intéressant de restaurer l'apoptose par inhibition de Bcl2. Le Vénétoclax (Venclyxto®) se lie sélectivement à Bcl2, libérant des protéines pro-apoptotiques qui initient la mort cellulaire programmée (Figure 22). En effet, bien que le Vénétoclax (BH3 mimetique), inhibiteur sélectif de Bcl-2, ait montré une activité limitée en monothérapie, sa combinaison avec des agents pro-apoptotiques (hypométhylants, cytarabine à faible dose) a démontré son efficacité et son innocuité[116].

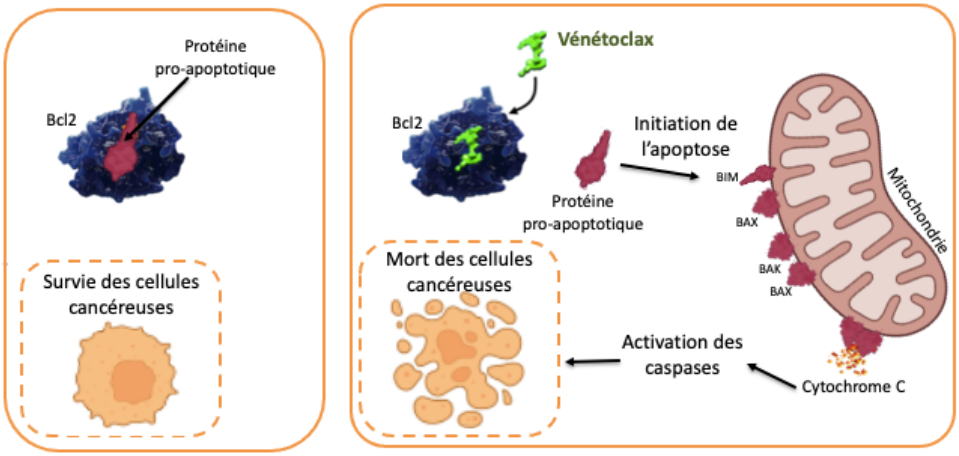

Figure 22: Mécanisme d'action du Vénétoclax

C'est pourquoi, le Vénétoclax a été approuvé par la FDA en 2016 chez les patients ayant une LAM au diagnostic, en première ligne, inéligibles à la chimiothérapie intensive et/ou âgés de plus de 75 ans, en se fondant sur des essais cliniques associant le Vénétoclax à la cytarabine faible dose ou aux déméthylants[116,117]. En effet, cette approbation est fondée en premier lieu sur les résultats des essais cliniques de phase 3 VIALE-A (étude randomisée, en double

aveugle). Ces résultats ont démontré que l'association Vénétoclax et Azacitidine améliore significativement la survie globale par rapport à l'Azacitidine seule ($p<.001$)[118].

La validation se fonde également sur les essais cliniques de phase 1b M14-358 (étude ouverte, non randomisée et multicentrique). Cet essai évalue le Vénétoclax en association avec des agents hypométhylants (Azacitidine ou Décitabine). Il a alors montré un profil de tolérance globale conforme aux profils de tolérance connus du Vénétoclax associé à l'Azacitidine et des deux médicaments seuls[119].
En France, il dispose d'une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM), post-Autorisation Temporaire d'Utilisation (ATU) dans le traitement de la LAM nouvellement diagnostiquée chez les patients adultes non-éligibles à une chimiothérapie d'induction standard, en association avec un agent hypométhylant.

Des études ont été réalisées afin de comprendre davantage les résultats cliniques prometteurs (rémissions profondes et durables, supérieures aux traitements conventionnnels) du Vénétoclax en association avec Azacitidine. Il a ainsi été démontré que l'inhibiteur sélectif de Bcl-2, inhibe le métabolisme mitochondrial. L'association a montré une perturbation du cycle de Krebs, se manifestant par une diminution de l'α-cétoglutarate et une augmentation des taux de succinate, suggérant une inhibition du complexe II de la chaîne de transport d'électrons (inhibe la respiration mitochondriale). Ainsi, le métabolisme énergétique joue sur la sensibilité des patients au Vénétoclax[120,121].

ii. Thérapies ciblées

Les thérapies ciblées correspondent à un ensemble de médicaments conçus pour bloquer la croissance ou la propagation des cellules tumorales en interférant soit avec des altérations moléculaires, soit avec des mécanismes qui sont à l'origine de leur développement ou de leur dissémination. Le terme « ciblée » est utilisé en raison d'une action plus spécifique sur les cellules tumorales, et par conséquent limitant les dommages induits aux cellules saines. Ces thérapies sont bien sûr réservées aux patients présentant les cibles[122–124].

A. Inhibiteur d'Isocitrate Déshydrogénase (IDH)

Le cycle de Krebs comporte 8 étapes afin d'oxyder l'acétyl-CoA. L'isocitrate est présente dans ce cycle et va subir une décarboxylation oxydative par l'IDH, permettant la formation d'α-cétoglutarate et générant du dioxyde de carbone (CO_2) et de la Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit (NADH). Le NADH, synthétisé par la réduction du NAD^+, est transféré à

la chaine de transport des électrons. Ainsi l'IDH est la 1ère enzyme qui relie le cycle de Krebs à la chaine respiratoire mitochondriale, elle-même directement en lien avec le métabolisme énergétique mitochondrial. Il existe 3 isoformes de l'IDH : l'IDH1 (cytosolique), l'IDH2 et l'IDH3 (mitochondriales). Les IDH appartiennent à une grande famille d'enzymes qui jouent un rôle central dans le métabolisme énergétique, la biosynthèse des acides aminés et la production des vitamines. Des mutations des IDH1 et 2 ont été découvertes par le séquençage intégral de tumeurs, dans une variété de tumeurs malignes, notamment la LAM. La protéine IDH résultant de la mutation réduit l'α-cétoglutarate en un oncométabolite, le 2-hydroxyglutarate (2-HG)[125].

Ainsi, les mutations ponctuelles somatiques d'IDH1/2 confèrent un gain de fonction aux cellules cancéreuses qui entraîne l'accumulation et la sécrétion d'un excès considérable d'un métabolite unique, qui est le D-2-hydroxyglutarate (D-2HG). La surproduction de D-2HG interfère avec le métabolisme cellulaire et la régulation épigénétique, contribuant à l'oncogenèse, puisque le D-2HG est un inhibiteur compétitif des dioxygénases dépendantes de l'α-cétoglutarate. Ceci conduit à une inhibition de la déméthylation de l'ADN, de l'ARN et des histones, aboutissant à un profil hyperméthylé et un blocage de la différenciation myéloïde (Figure 23).

Les scientifiques ont développé des inhibiteurs d'IDH muté, utilisés par exemple dans le cadre des LAM, et qui arrivent maintenant dans notre arsenal thérapeutique. Les inhibiteurs des enzymes mutantes IDH1/2 représentent une nouvelle classe de médicaments pour un traitement ciblé. Ces inhibiteurs sont entrés dans des essais cliniques combinés pour les patients porteurs de mutations IDH1/2. On retrouve par exemple, l'Ivosidénib et l'Énasidénib qui sont respectivement des inhibiteurs sélectifs d'IDH1 et IDH2 mutées[126,127].

Par exemple, en France, l'Ivosidenib fait l'objet d'une Autorisation Temporaire d'Utilisation Nominative (ATUn) dans l'indication « Traitement en monothérapie des patients adultes atteints de LAM avec une mutation du gène IDH1 R132 en rechute ou réfractaires à partir de la 3ème ligne ou à partir de la 2ème ligne pour les patients non éligibles à une chimiothérapie intensive de rattrapage ».

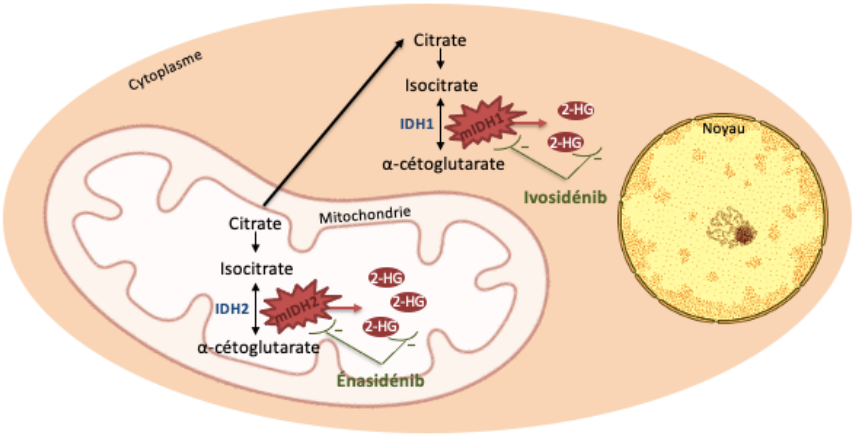

Figure 23: Mécanisme d'action des inhibiteurs d'Isocitrate Déshydrogénase (IDH)

Cette approbation d'autorisation est due à des études comme un essai clinique de phase III (étude en double aveugle, randomisée et contrôlée par placebo) sur 146 patients issus d'une 20^{aine} de pays, âgés en moyenne de 75 ans au moment du diagnostic de LAM avec mutation IDH-1 et inéligibles à une chimiothérapie intensive[128].

Les patients ont été répartis aléatoirement en 2 groupes, soit le groupe recevait de l'Ivosidenib (500 mg en une prise quotidienne) et de l'Azacitidine en IV ou sous-cutanée (SC), soit il recevait, dans les mêmes conditions, un placebo avec de l'Azacitidine. Suivi sur 12 mois, le critère d'évaluation principal de l'étude était la survie sans événement (EFS), c'est-à-dire l'absence d'échec, de rechute, de progression de la maladie ou de décès. Les résultats montrent que les risques de récidive ou de décès sont réduits de 67% dans le groupe ayant reçu la combinaison de traitement et également que 38% de ces patients traités étaient en rémission complète après 24 semaines par rapport à 11% pour le groupe contrôle.

De la même manière, *Stuani et al.* (2021), ont pu montrer à partir de lignées cellulaires, de PDX et de patients atteints de LAM présentant la mutation IDH, un métabolisme mitochondrial amélioré. Ce métabolisme énergétique se produit par l'augmentation de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire, de la respiration mitochondriale et de la β-oxydation des acides gras induite par la CEBPα liée à la méthylation des cellules mutantes IDH1. C'est pourquoi, le métabolisme énergétique joue sur la sensibilité des patients aux inhibiteurs d'IDH[16].

B. Inhibiteur de FLT3-ITD

FLT3 appartient à la famille des récepteurs à Tyrosine Kinase (TK) de classe III. Il se compose de 5 domaines extracellulaires de type immunoglobuline, d'un domaine transmembranaire, d'un domaine juxta-membranaire et de 2 domaines intracellulaires tyrosine kinase (TK1/TK2) liés par un domaine d'insertion de kinase. La fixation du ligand de FLT3 sur le récepteur FLT3,

entraine la dimérisation du récepteur et l'activation de son domaine TK, qui est stabilisé par autophosphorylation. FLT3 phosphorylé transduit des signaux d'activation mitogénique grâce à différentes voies de signalisation. Ces données ont conduit les équipes de recherche à explorer l'état de FLT3 dans les leucémies et ont ainsi pu voir que ce récepteur transmembranaire est exprimé dans la grande majorité des LAM. Dans ce contexte, l'activation du récepteur FLT3 par son ligand entraîne la prolifération des cellules leucémiques, mais également l'inhibition de l'apoptose[82,129].

Il faut savoir qu'il a été décrit des mutations du récepteur FLT3 dans les LAM, pour une incidence globale de 30-35%. La mutation la plus fréquente correspond à une duplication en tandem d'un nombre variable de triplets nucléotidiques à l'intérieur du gène de FLT3, sur l'exon 11 et 12 prolongeant ainsi le domaine juxta-membranaire du récepteur. Ainsi cette mutation dite FLT3-ITD (FLT3-Internal Tandem Duplications) rend le récepteur FLT3 indépendant de son ligand, entrainant une activité TK constitutivement active, ce qui est associé à des phénomènes de rechute et un mauvais pronostic vital. Une deuxième mutation est possible sur ce gène, FLT3-TKD, qui est une mutation ponctuelle au niveau du domaine tyrosine kinase, présente chez 5% des patients atteints de LAM. C'est pourquoi après la découverte de ces mutations activatrices de FLT3, celles-ci sont devenues une cible thérapeutique d'intérêt. Aujourd'hui, plus de 20 inhibiteurs de TK (ITK) ont une activité sur FLT3. La majorité de ces médicaments sont des composés hétérocycliques qui inhibent l'activité de FLT3 par liaison au site ATP dans le domaine TK du récepteur. Cette compétition avec l'ATP, inhibe l'autophosphorylation ligand-indépendante du récepteur, donc l'activation de ses substrats et celle des voies de signalisation en aval. Les FLT3-ITK peuvent être classés en 2 catégories fonctionnelles selon 2 conformations de FLT3 en lien avec la position des acides aminés Asp-Phe-Gly, ou "DFG", qui sont à la base de la boucle d'activation. Ainsi, dans la position «DFG-in», la poche à ATP est accessible puisque la boucle est dépliée et donc la kinase est active, alors que dans la position «DFG-out», la boucle est repliée sur la poche à ATP, ce qui la rend inaccessible, d'où une kinase inactive et les acides aminés en position D835 et Y842 stabilisant la conformation. Les FLT3-ITK de type I ciblent ces deux conformations et sont, en règle générale, efficaces dans les LAM avec mutation de type FLT3-ITD et FLT3-TKD. Elle comprend ainsi principalement des inhibiteurs multikinases initialement utilisés dans les tumeurs solides tels que la Midostaurine alors que les FLT3-ITK de type II ciblent exclusivement la conformation «DFG-out» du récepteur, donc comprend des inhibiteurs plus spécifiques, tels que le Quizartinib[130].

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 F_0-F_1 ATP synthase et un inhibiteur de FLT3 induit une dépolarisation rapide de la membrane mitochondriale interne (MMI), provoque une crise énergétique caractérisée par une diminution du niveau d'ATP et favorise la production d'anions superoxydes[85]. Par ailleurs l'association d'inhibiteur de FLT3 avec une inactivation de la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PD) constitue 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[131]. Ainsi, le métabolisme énergétique joue sur la sensibilité des patients avec des inhibiteurs de FLT3-ITD.

8) *Médecine de précision*

Ces dernières années, la prise en charge des LAM a évolué et ce, notamment grâce aux avancées de la biologie moléculaire ouvrant ainsi la possibilité de la mise en place de la médecine de précision. Les nouvelles technologies ont permis l'identification d'un nombre important de mutations dans la LAM et donc d'avoir une vue d'ensemble des anomalies génétiques propres au patient mais également d'étudier les conséquences de leurs présences sur la survie des patients (Figure 24)[132].

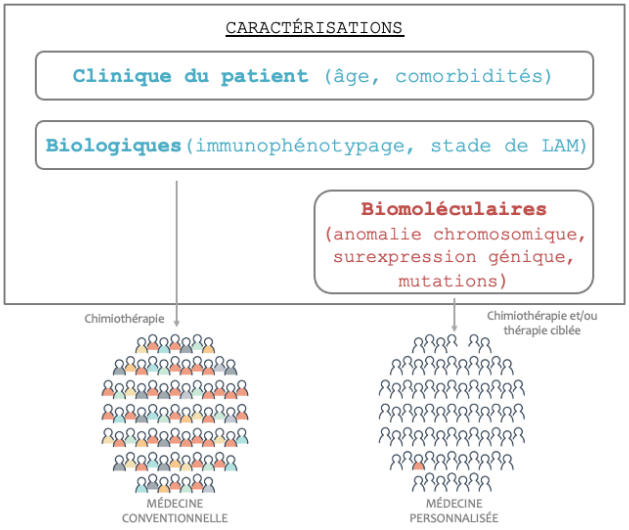

Figure 24: Schéma des critères de prise en charge des patients, *d'après Boissel, Nicolas et al., et Papaemmanuil Elli et al.*[114,133]

De ce fait, c'est un basculement vers une médecine de précision en proposant au patient un traitement adapté aux caractéristiques de sa pathologie, ce qui permet d'augmenter le nombre de rémission au sein des patients atteints de LAM.

i) Limite actuelle

Comme expliqué précédemment, la prise en charge dépend en partie de la classification de la LAM. C'est pourquoi, actuellement, les recommandations de l'ELN permettent depuis plusieurs années d'orienter les cliniciens vers les choix thérapeutiques les plus efficaces pour soigner les patients atteints de LAM. Bien que cette classification constitue un outil intéressant pour évaluer l'agressivité de la maladie, elle trouve une certaine limite dans la précision de sa prédiction. En effet, cette classification reste imparfaite puisque la réponse aux traitements et le pronostic peuvent varier au sein d'un même groupe de risque. À titre d'exemple, une étude clinique a montré que trois ans après le diagnostic, 1/3 des patients avec un profil favorable était décédé, tandis que dans le groupe à profil défavorable, 20% des patients étaient toujours vivants. Ces résultats ont émis l'hypothèse qu'il existe donc une marge de progression quant à la manière de classifier les patients (Figure 25)[83,133–135].

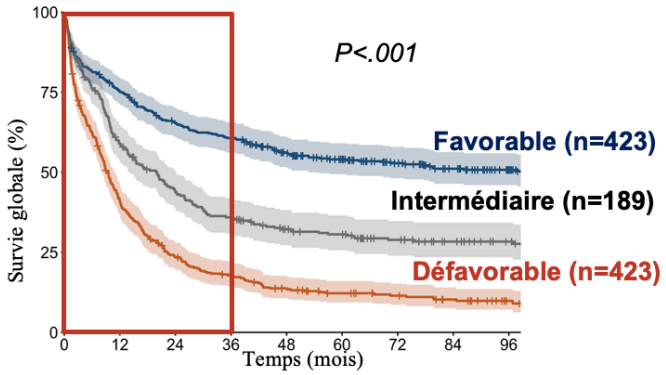

Figure 25: Courbes de survie selon la classification ELN appliquée à une large cohorte de patients, *d'après Tobias Herold et al.*[83]

Cette limite peut s'expliquer par le fait que l'existence d'un set de mutations n'est pas suffisante pour définir la physiologie tumorale. En effet, les modifications phénotypiques consécutives à l'apparition d'une mutation dépendent de nombreux facteurs. Il y a donc une nécessité de développer à côté de ces marqueurs génétiques, des marqueurs fonctionnels plus proche de la physiologie cellulaire. En ce sens, la classification ELN pourrait faire l'objet d'une amélioration via l'utilisation en complément des marqueurs biologiques fonctionnels comme le métabolisme mitochondrial.

En effet, comme nous l'avons vu, le métabolisme mitochondrial intervient dans les mécanismes de résistance des 4 traitements fondamentaux, qui sont l'Ara-C, le Venetoclax, et les thérapies ciblées avec les inhibiteurs d'IDH et de FLT3-ITD. Ainsi, le métabolisme énergétique mitochondrial est une cible potentielle dans la réponse aux traitements. C'est pourquoi, le métabolisme énergétique fait l'objet du prochain paragraphe.

III. Métabolisme énergétique mitochondrial

a) Acteurs moléculaires du métabolisme énergétique

Le métabolisme correspond à l'ensemble des réactions biochimiques se déroulant au sein des cellules d'un organisme. Il correspond à la somme de 2 mécanismes : l'anabolisme et le catabolisme. L'anabolisme représente la synthèse des substrats métaboliques nécessaires à la vie des tissus et a pour but d'assurer le fonctionnement cellulaire et de constituer des réserves. Les voies cataboliques quant à elles, décomposent des molécules complexes provenant des nutriments en molécules simples qui constituent des précurseurs nécessaires à la biosynthèse, puisqu'ils permettent la transformation en énergie des nutriments et des produits intermédiaires du métabolisme. Ces voies permettent de libérer de l'énergie sous une forme utilisable par la cellule. Les réactions biochimiques forment un réseau de voies métaboliques interdépendantes. Au centre du réseau se situe le métabolisme énergétique défini par l'ensemble des réactions biochimiques qui permettent de produire de l'énergie (Figure 26). Le métabolisme énergétique est constitué de deux voies cataboliques principales : la glycolyse et le métabolisme mitochondrial comprenant le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative (OxPhos)[136].

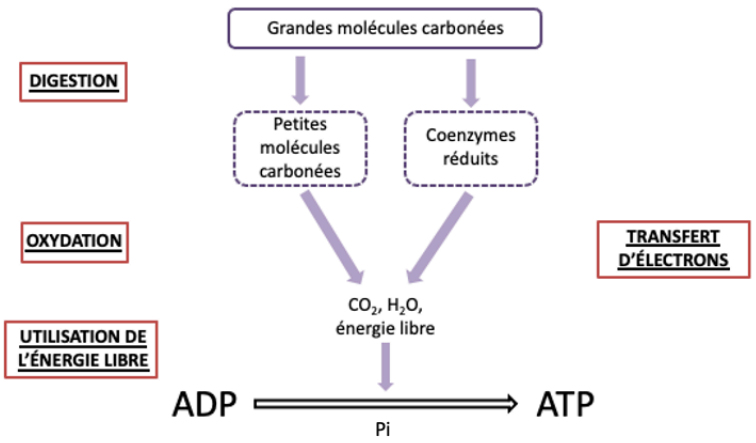

Figure 26: Schéma des relations entre le catabolisme et la synthèse d'ATP (O_2, Oxygène ; e^-, électrons ; ADP, Adénosine diphosphate ; ATP, Adénosine triphosphate ; CO_2, Dioxyde de carbone ; H_2O, eau ; Pi, Phosphate inorganique)

La majeure partie des substrats énergétiques provient de l'alimentation (lipides, acides aminés, glucides). Pour réaliser ce processus, la respiration est indispensable car elle permet d'apporter l'oxygène nécessaire à l'ensemble des réactions biochimiques. À la suite de réactions de catabolisme se trouvent les métabolites ultimes (CO_2, Ammoniac (NH_3), Eau (H_2O)), qui seront éliminés, et une production de l'énergie sous forme d'ATP, qui est le donneur universel d'énergie. Il faut savoir que l'ATP est produit par la glycolyse, mais également la phosphorylation oxydative à la suite du cycle de Krebs.

1) *La glycolyse*

Une fois dans la circulation sanguine, le glucose, qui est une molécule très hydrophile et de petite taille, circule librement. La glycolyse est la voie principale d'utilisation du glucose : il s'agit d'une voie métabolique cytosolique, qui est présente dans toutes les cellules, permettant la production d'énergie sous forme d'ATP. La glycolyse débute par l'absorption du glucose qui est médiée par les transporteurs transmembranaires du glucose (GLUT). À la suite de cette entrée dans le cytosol, le glucose est immédiatement phosphorylé par l'hexokinase (HK-2) en glucose-6-phosphate (G6P). Cette voie catabolique conduit à la conversion d'une molécule de glucose en 2 molécules de pyruvate avec production de 2 molécules d'ATP (Figure 27)[137,138].

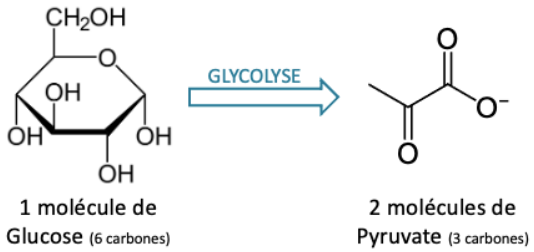

Figure 27: Finalité de la voie glycolytique

Cette voie dite d'Emdben-Meyerhof conduit donc à l'oxydation progressive d'une molécule de glucose, molécule à 6 carbones, en 2 molécules de pyruvate, molécule à 3 carbones. Elle se déroule exclusivement dans le cytosol et par une succession de 10 réactions dont 3 irréversibles, et conduit à la molécule de pyruvate ainsi qu'à la génération de NADH (Figure 28). La glycolyse peut être scindée en 3 grandes étapes :

- *Étape 1 :* Passage du glucose au fructose-1,6-bi-phosphate.
- *Étape 2 :* Passage d'une molécule à 6 carbones, le fructose-1,6-bi-phosphate, à 2 molécules à 3 carbones, le glycéraldéhyde-3-phosphate.
- *Étape 3 :* Passage du glycéraldéhyde-3-phosphate au pyruvate.

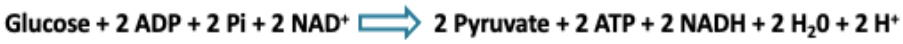

Figure 28: Bilan énergétique de la glycolyse (ADP, Adénosine diphosphate ; Pi, Phosphate inorganique ; NAD^+, nicotinamide adénine dinucléotide ; ATP, Adénosine triphosphate ; NADH, nicotinamide adénine dinucléotide réduit ; H_2O, eau ; H^+, proton)

Cependant, il faut prendre en compte que le bilan est différent en fonction des conditions dans lesquelles les cellules se trouvent. En condition anaérobie, et dans les cellules sans mitochondries comme les globules rouges, le bilan est de 2 ATP/glucose, ce qui est assez faible. En condition aérobie, dans les cellules avec mitochondries, 2 ATP/glucose sont également obtenu par la glycolyse mais les atomes d'hydrogène (H^+) et les électrons de NADH vont passer dans les mitochondries, où il y aura une cascade de réaction qui conduit à un bilan d'environ 36 ATP/glucose. Ainsi la glycolyse en elle-même, bien que peu rentable, est d'une importance fondamentale car elle est universelle et ubiquitaire à tous les organismes, des bactéries les plus primitives à l'Homme[139–144].

Dans les LAM, il a été montré qu'il existait une association entre la surexpression de GLUT1 et une faible sensibilité aux chimiothérapies. En plus de leur avidité pour le glucose, les LAM utilisent également le fructose, un autre hexose pouvant être utilisé pour la glycolyse[138]. 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[145].

2) *Le devenir du pyruvate*

À la suite de la glycolyse, le pyruvate a plusieurs devenirs en fonction des organismes et des types cellulaires mais également du contexte métabolique. En effet, le pyruvate peut se transformer en éthanol, en lactate ou en acétyl coenzyme A. En l'absence d'oxygène, le pyruvate produit au cours de la glycolyse est réduit en lactate, réaction catalysée par la L-lactate déshydrogénase (LDH), qui possède le NADH comme coenzyme. L'oxydation du NADH permet le maintien d'un flux glycolytique élevé. Une fois produit, le lactate est expulsé dans le milieu extracellulaire par des transporteurs : mono-carboxylates (MCT). Cette sortie du lactate est associée à une sortie de proton, qui entraine une acidification extracellulaire[146]. D'ailleurs certaines techniques mesurent l'acidification extracellulaire pour évaluer l'activité de la glycolyse (technologie XFe Seahorse) (cf page 78).

En présence d'oxygène, le pyruvate produit entre majoritairement dans la mitochondrie, pour être substrat du cycle de Krebs.

Ainsi, la mitochondrie tient une place importante dans la cellule puisqu'elle participe à de nombreux processus cellulaires dont une fonction principale repose sur la production d'énergie. L'entrée du pyruvate au niveau de la matrice mitochondriale est sous la dépendance du transporteur mitochondrial pyruvate carrier (MPC) (Figure 29). 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[142–144].

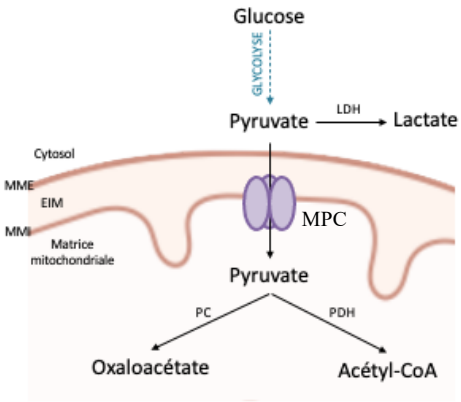

Figure 29: Schéma représentant les différentes voies cataboliques du pyruvate (LDH, Lactate deshydrogénase ; MPC, Mitochondrial pyruvate carrier ; PC, Pyruvate carboxylase ; PDH, Pyruvate déshydrogénase ; MMI, Membrane mitochondriale interne ; MME, Membrane mitochondriale externe ; EIM, Espace intermembranaire mitochondrial)

3) *Le cycle de Krebs*

Ce cycle portant également le nom de cycle de l'acide citrique mais aussi cycle des acides tricarboxyliques, est un carrefour du métabolisme intermédiaire, qui relie pratiquement toutes les voies du catabolisme et la plupart de celles de l'anabolisme, mais son rôle principal est associé au catabolisme. Il se compose de réactions séquentielles formant une boucle, et se déroule en aérobiose dans la matrice mitochondriale. Le cycle de Krebs est alimenté par l'acétyl-CoA provenant à la fois de l'oxydation du pyruvate issu de la glycolyse, de l'oxydation des acides gras (β-oxydation), ainsi que du glutamate provenant de la désamination de la glutamine.

En ce qui concerne le pyruvate, une fois qu'il pénètre l'espace matriciel de la mitochondrie par les transporteurs spécifiques MPC, il est transformé en acétyl-CoA par le complexe enzymatique de la pyruvate déshydrogénase (PDH).

La première réaction spécifique au cycle de Krebs permet l'association de l'acétyl-CoA à l'oxaloacétate, formant ainsi le citrate par l'intermédiaire de la citrate synthase. Cette réaction permet la réduction du NAD^+.

Le citrate peut soit rester dans le cycle de Krebs, soit être exporté hors de la mitochondrie par son transporteur afin de soutenir la synthèse des lipides. Le citrate restant est ensuite converti en isocitrate par l'aconitase. Ce dernier subit une décarboxylation oxydative par IDH afin de produire l'α-cétoglutarate. L'IDH est la première enzyme qui crée le lien entre cycle de Krebs et la chaine respiratoire en synthétisant du NADH par réduction du NAD^+. Ce NADH produit va rejoindre la chaine de transport des électrons mitochondriaux afin de faire fonctionner l'OxPhos et produire l'ATP. À partir de l'α-cétoglutarate, α-cétoglutarate déshydrogénase produit le succinyl-CoA accompagné de NADH. La transformation du succinyl-CoA en succinate par la succinyl-CoA synthétase permet la synthèse d'une molécule de GTP. Par la suite, l'oxydation du succinate en fumarate par la succinate déshydrogénase conduit à la production d'une molécule de $FADH_2$ qui est aussi, comme NADH, un des cofacteurs essentiels au fonctionnement de la chaine respiratoire mitochondriale. Le fumarate produit est converti en malate par le fumarate hydratase et la dernière réaction du cycle de Krebs permet la régénération de l'oxaloacétate par la malate deshydrogénase en produisant le NADH (Figure 30)[147].

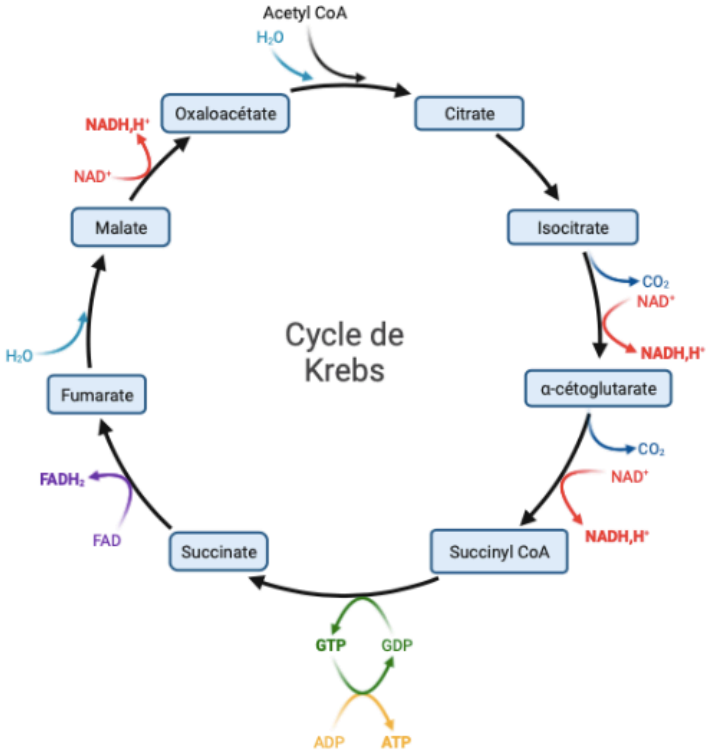

Figure 30: Schéma représentant les principales réactions du cycle de Krebs (ADP, Adénosine diphosphate ; ATP, Adénosine triphosphate ; CO_2, Dioxyde de carbone ; H_2O, Eau ; NAD^+, Nicotinamide adénine dinucléotide ; NADH, Nicotinamide adénine dinucléotide réduit ; H^+, Proton ; GTP , Guanosine triphosphate ; GDP, Guanosine diphosphate ; FAD, Flavine adénine dinucléotide ; $FADH_2$, Flavine adénine dinucléotide réduit)

L'ensemble de ses métabolites appartenant au cycle des acides tricarboxyliques peut être mesuré par des techniques de la métabolomique afin d'évaluer le métabolisme énergétique (cf page 97).

Le cycle de Krebs aboutit ainsi à la production de co-enzymes réduits NADH et $FADH_2$ et de CO_2. Ensuite, les réactions d'oxydation mitochondriale mettant en jeu l'oxygène, l'hydrogène et les transferts d'électrons aboutissent à la production d'H_2O, et génèrent une grande quantité d'énergie utilisable pour la synthèse de l'ATP.

Le cycle de Krebs peut être régulé au niveau de ses étapes irréversibles, c'est-à-dire, la citrate synthase, l'isocitrate déshydrogénase et l'α-cétoglutarate déshydrogénase. La citrate synthase est activée par l'ADP et inhibée par le NADH, l'ATP et le citrate. L'isocitrate déshydrogénase, quant à elle, est activée par le calcium et l'ADP et inhibé par le NADH et l'ATP. Enfin, l'α-cétoglutarate déshydrogénase est activée par le calcium et inhibée par le NADH, l'ATP et le succinyl-CoA.

Pour aboutir au bilan énergétique de ce cycle, il faut comptabiliser les coenzymes hydrogénés donneurs d'électrons à la chaîne respiratoire :

- 3 molécules de $NADH,H^+$ génératrices de 7,5 ATP ;
- 1 molécule de $FADH_2$ génératrice de 1,5 ATP ;
- 1 molécule d'ATP générée à partir d'une molécule de GTP.

Ainsi, le total est de 10 ATP par tour de cycle, ou encore par groupement acétylé oxydé en 2 molécules de CO_2. C'est pourquoi, la chaîne respiratoire mitochondriale suit ce processus afin que l'énergie des oxydations soit récupérée sous forme d'énergie chimique, ATP.

4) *La bioénergétique mitochondriale*

La chaine respiratoire est un ensemble physique et fonctionnel, localisé dans la membrane interne des mitochondries, qui va permettre la production d'énergie sous forme d'ATP et d'H_2O. En effet, la chaîne respiratoire produit de l'ATP et de l'H_2O à partir des hydrogènes des molécules énergétiques ($NADH_2$, $FADH_2$) et de l'oxygène de l'air. Cette chaine respiratoire est localisée dans la MMI. Il faut savoir que la MME est perméable, contrairement à la MMI qui est très imperméable. Ainsi, pour franchir cette dernière, il faudra donc des transporteurs. La chaine respiratoire est donc constituée de complexes protéiques dénombrés de I à IV et de navettes.

- ***Complexe I = NADH-Q-oxydoréductase :*** Ce complexe présente le transporteur flavine mononucléotide (FMN), qui permet le transport à la fois des électrons et des protons H^+. Le substrat du complexe I est le $NADH,H^+$ qui réduit le FMN de la NADH déshydrogénase[148,149].

        - *Navette :* ***Co-enzyme Q = Ubiquinone :*** Petit transporteur lipophile donc très mobile, dynamique, dans la membrane mitochondriale. Ce co-enzyme Q transporte à la fois des électrons et des protons.
    - ***Complexe II = Succinate-Q-reductase :*** Ce complexe est localisé au niveau de la MMI, et présente une activité enzymatique, succinate déshydrogénase, que l'on retrouve dans le cycle de Krebs. Le substrat du complexe II est le succinate et le FAD, coenzyme du complexe II, réduit l'ubiquinone[150,151].
    - ***Complexe III = Q – Cytochrome - C oxidoreductase:*** transfère les électrons de l'ubiquinol aux cytochromes b, c1 puis c[152].
        - *Navette :* ***Cytochrome C (CytC):*** Petite molécule hydrophile, mobile. Permet le passage des électrons du complexe III au complexe IV.
    - ***Complexe IV = Cytochrome C oxydase :*** transfert des électrons à l'oxygène moléculaire puis à la production de molécules d'eau[153].

D'ailleurs, pour évaluer le métabolisme énergétique mitochondrial, certaines techniques mesurent l'activité enzymatique de ces complexes de la chaîne respiratoire (cf page 91).

Les électrons à haut potentiel de transfert du NADH vont être transférés au niveau de la NADH déshydrogénase, pour redonner du NAD^+, tandis que ceux du succinate y entrent au niveau du complexe II, pour donner du fumarate. Dans ces deux cas, les électrons proviennent de la matrice mitochondriale et sont transférés à la coenzyme Q10 (ubiquinone) pour former de l'ubiquinol (Q10H2), liposoluble, qui diffuse dans la bicouche lipidique constituant la MMI. Puis le complexe III, transfère les électrons du Q10H2 au CytC dans l'espace intermembranaire, et la cytochrome c oxydase transfère les électrons de 4 cytochromes c réduits à une molécule d'oxygène pour former deux molécules d'H_2O. Dans cette optique, une technique permet de mesurer la consommation d'oxygène pour évaluer le métabolisme énergétique mitochondrial (cf XFe seahorse page 87).

Les électrons vont passer d'un complexe à l'autre jusqu'à l'accepteur final, qui est l'oxygène moléculaire. D'ailleurs, ce transport des électrons à travers la chaine respiratoire s'accompagne d'une sortie de protons de la matrice au niveau du complexe I, III et IV. Ces protons se retrouvent alors dans l'espace intermembranaire, ce qui entraine la création d'un gradient avec une différence de potentiel électrique transmembranaire ($\Delta\psi$) et de pH (ΔpH).

Cette différence de potentiel électrique entre les deux faces d'une membrane cellulaire définit un potentiel de membrane ($\Delta\psi m$). D'ailleurs, celui-ci peut être mesuré par des techniques de cytométrie en flux afin d'évaluer le métabolisme mitochondrial (cf page 78).

La combinaison de tous ces gradients donne un gradient électrochimique, qui génère une force protomotrice utilisée pour la synthèse d'ATP. En effet, les protons vont alors chercher à retourner dans la matrice mitochondriale pour équilibrer les charges et le seul moyen d'y parvenir est de passer par le complexe de l'ATP synthase. Ainsi, le couplage de la respiration à la phosphorylation de l'ADP se fait par l'intermédiaire d'un gradient de protons généré par la chaîne respiratoire, qui est utilisé par l'ATP synthase (Figure 31)[154,155].

Bien qu'il ne fasse pas partie de la chaine respiratoire, le complexe enzymatique responsable de la synthèse d'ATP est l'ATP synthase, aussi appelé complexe V. Il utilise le gradient de protons généré par le transfert d'électrons le long des 4 complexes de la chaine respiratoire afin de regénérer de l'ATP à partir d'ADP (amené de l'extérieur) et de Phosphate inorganique (Pi). Une fois généré, l'ATP va sortir.

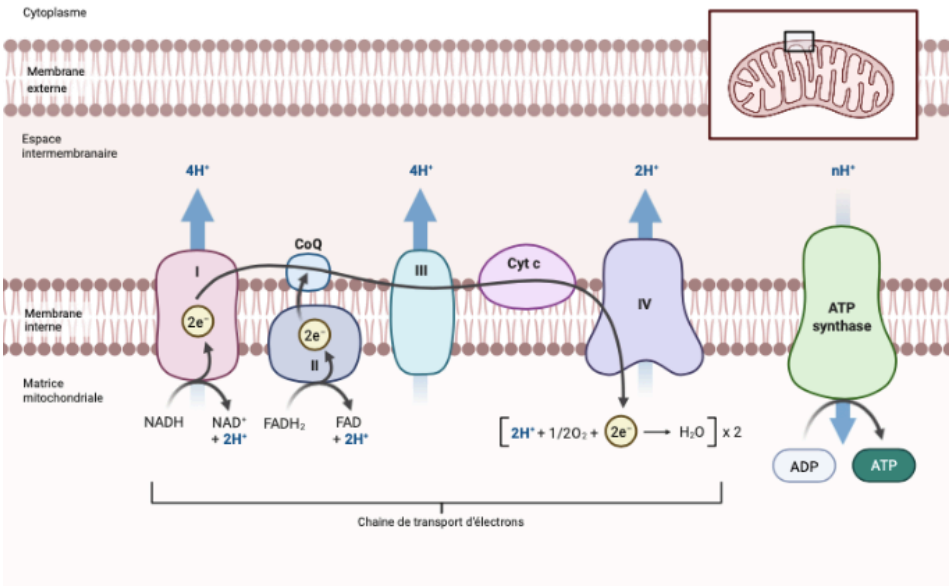

Figure 31: Schéma des complexes de la chaîne respiratoire

L'activité de l'OxPhos varie selon les besoins en ATP. Au plus la cellule a des besoins d'ATP, au plus elle consommera de substrats et donc d'oxygène. C'est un couplage énergétique, entre l'activité du cycle de Krebs, la chaine respiratoire et l'ATP synthase. Il faut savoir que pour avoir une molécule d'ATP, il faut qu'il y ait environ 3 protons qui rentrent dans la matrice par l'ATP synthase. Cependant, il est difficile d'estimer précisément le nombre de protons qui va sortir au niveau de chacun des complexes, mais on estime qu'au final :

- Le complexe I : sortie de 4 protons
- Le complexe II : sortie de 0 protons
- Le complexe III : sortie de 4 protons
- Le complexe IV : sortie de 2 protons

Par exemple, pour une paire d'électrons transférée du $NADH_2$ jusqu'à l'accepteur final (oxygène) dans la chaine respiratoire, 10 protons vont sortir de la matrice et donc 10 protons vont rentrer. En sachant qu'il en faut 3 pour fabriquer une molécule d'ATP, on aura 2,5 molécules d'ATP qui seront produites pour une molécule de NADH produite. De la même manière, le $FADH_2$ rentre au niveau du complexe 2, ce qui va entrainer la sortie de 6 protons et donc l'entrée de 6 protons. Ainsi, 1,5 molécules d'ATP sont produites par le transfert des électrons d'une molécule de $FADH_2$ jusqu'à l'oxygène final.

Ce paragraphe a permis de décrire les différents mécanismes liés à la production d'énergie et de mentionner les techniques qui les mettent en évidence : l'oxymétrie, la métabolomique, la mesure de l'activité enzymatique des complexes de la chaîne respiratoire et la mesure du potentiel de membrane. Maintenant que ces acteurs moléculaires du métabolisme énergétique ont été définis, les paragraphes suivants vont faire l'état de l'art du métabolisme des cellules saines et leucémiques.

b) Métabolisme énergétique d'une cellule saine hématopoïétique

1) *Cellules souches hématopoïétiques*

Dans l'hématopoïèse, les CSH constituent le premier phénotype métabolique cellulaire. Ces cellules reposent dans un état relatif de quiescence et présentent des besoins métaboliques réduits qui se traduisent par un hypométabolisme[156].

Comme précisé précédemment, ces cellules résident dans la MO qui est un microenvironnement hypoxique. D'ailleurs, il a été mis en évidence que les CSH expriment de manière accrue le facteur 1 alpha inductible par hypoxie (HIF1α). D'un point de vue cellulaire, HIF1α soutient l'expression des pyruvates déshydrogénases kinases (PDHK) 2 et 4, enzymes inhibant la PDH, responsable de la transformation du pyruvate en acétyl-CoA. De cette manière, l'hypoxie conditionne le métabolisme des CSH en favorisant la glycolyse anaérobie[157,158].

L'OxPhos, quant à lui, serait importante au maintien de la quiescence des CSH. En effet, une étude sur un modèle murin a montré que la délétion d'une sous-unité du complexe III de la chaîne respiratoire entrainait une perte de la quiescence des CSH[159].

2) *Progéniteurs hématopoïétiques*

Les progéniteurs, eux, représentent le 2nd phénotype métabolique cellulaire et ont un potentiel de prolifération important. C'est pourquoi, ce phénotype métabolique doit répondre aux besoins

énergétiques et anaboliques de ces cellules, qui présentent une avidité importante pour la captation de nutriments. En effet, les besoins des progéniteurs hématopoïétiques en termes de prolifération sont des besoins qui visent à soutenir la production de macromolécules à travers le métabolisme anabolique. Par exemple, l'expression de GLUT1, transporteur du glucose, est augmentée au cours de la différenciation des cellules dendritiques[160].

3) *Cellules hématopoïétiques différenciées*

Les cellules différenciées présentent différents types de métabolisme énergétique, conditionnés par la fonction cellulaire qu'elles assurent. Par exemple, les neutrophiles sont des cellules présentant très peu de mitochondries, donc leurs métabolismes énergétiques reposent essentiellement sur la glycolyse. De la même manière, le métabolisme glycolytique est l'unique option des érythrocytes étant donné qu'au cours de leurs différenciations leurs mitochondries sont éliminées par autophagie[161].

Les monocytes, quant à eux, peuvent adopter un métabolisme soit préférentiellement glycolytique dans le cadre d'une différenciation en macrophage pro-inflammatoire (type M1) soit favorable à la OxPhos si le monocyte s'oriente vers un phénotype macrophagique anti-inflammatoire (type M2). Les plaquettes augmentent à la fois leur métabolisme glycoplytique et leur OxPhos[162,163].

Il y a ainsi une diversité de comportement métabolique au sein des cellules hématopoïétiques saines conditionnées par leur phénotype cellulaire (Figure 32).

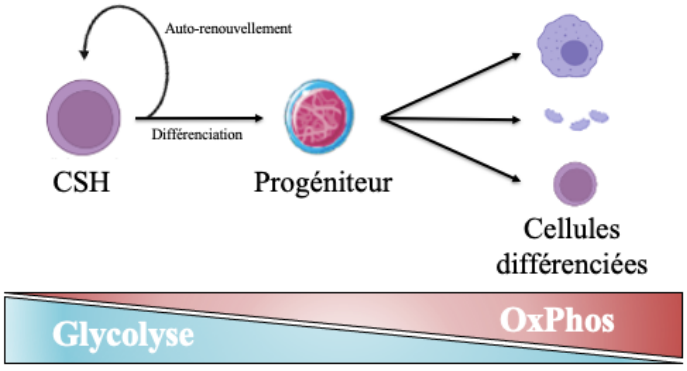

Figure 32: Évolution métabolique des cellules hématopoïétiques au cours de la différenciation

Le métabolisme dépend du type cellulaire mais également de l'âge. En effet, les monocytes issus de sujets sains âgés de 60 à 80 ans présentent une OxPhos plus faibles que les sujets sains âgés de 18 à 35 ans[164].

c) Métabolisme mitochondrial énergétique des LAM

1) *Cellules souches leucémiques*

Les CSL présentent un hypométabolisme caractérisé par une faible activité glycolytique et une faible chaîne respiratoire mitochondriale (OxPhos)[61,69].

Le métabolisme des CSL est totalement différent de celui des CSH, dans les LAM. En effet, lorsqu'on inhibe l'OxPhos dans des CSL, elles n'arrivent pas à augmenter leur activité glycolytique, ce qui entraine leurs morts. Elles présentent donc une addiction plus importante pour l'OxPhos pour répondre à leurs besoins énergétiques, car elles ne peuvent pas augmenter significativement la glycolyse en compensation de la chute de l'OxPhos (Figure 33)[57].

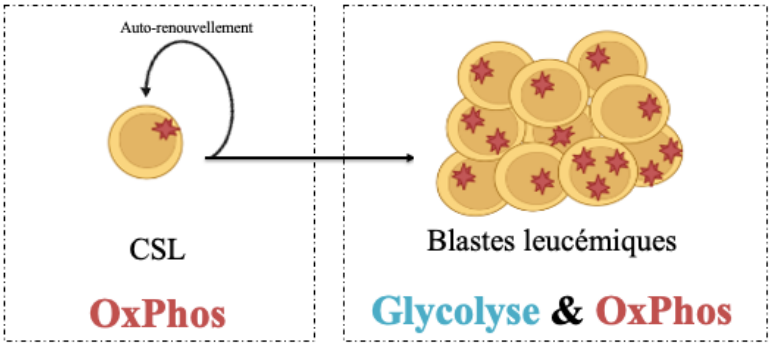

Figure 33: Processus métaboliques actifs au sein des cellules souches leucémiques et des blastes leucémiques

2) *Cellules leucémiques en prolifération*

Les cellules blastiques de LAM peuvent être hautement glycolytiques, ce qui est corrélé à un mauvais pronostic[165,166]. D'ailleurs, l'inhibition de la glycolyse améliore la cytotoxicité de la cytarabine et la suppression de plusieurs enzymes de glycolyse retarde la progression de la leucémie. Cependant, les cellules leucémiques en prolifération devenues résistantes après certains traitements, peuvent reprogrammer leur métabolisme au profit d'une phosphorylation oxydative exacerbée[167].

3) *Métabolisme de la LAM : Nouvelle approche diagnostique ?*

La mitochondrie joue un rôle central dans le métabolisme énergétique. Comme nous l'avons vu, dans la littérature, le métabolisme des LAM et en particulier le fonctionnement énergétique

des mitochondries est clairement identifié comme une caractéristique influençant la réponse aux thérapies anti-tumorale. En effet, les cellules leucémiques issues de LAM nouvellement diagnostiquées présentent des phénotypes métaboliques différents en fonction des caractéristiques cytologiques et génétiques des blastes[167]. Chez les patients traités par certaines chimiothérapies (*exemple :* cytarabine), les cellules leucémiques devenues résistantes reprogramment de nouveau leur métabolisme : elles dépendent davantage de la phosphorylation oxydative mitochondriale (OxPhos) et moins de la glycolyse. C'est pourquoi, des fonctions mitochondriales essentielles contribuent donc à la résistance et représentent une voie thérapeutique pour traiter la chimiorésistance et la maladie résiduelle[12]. Des études précliniques ont montré que l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de l'OxPhos (Oligomycine[85], CB839[131]) ou de médicaments ayant une activité similaire (Metformine® ou Tigécycline[168]) augmente la mort cellulaire des LAM et favorise l'éradication des CS cancéreuses à l'origine des épisodes de récidives.

4) *Comment cibler les LAM par l'intermédiaire du métabolisme comme approche thérapeutique ?*

Aujourd'hui le métabolisme énergétique est devenu une cible thérapeutique d'intérêt en cancérologie et particulièrement dans les LAM[169]. De nouvelles molécules (MitoCANS) sont évaluées dans le cadre d'essais cliniques pour le traitement des LAM en monothérapie. Elles peuvent cibler les protéines de la chaîne respiratoire (*exemple* : IACS-010759), le métabolisme de la glutamine (CB839) ou la traduction des protéines mitochondriales (Tigécycline). Des associations de molécules ciblant le métabolisme énergétique mitochondrial avec des traitements conventionnels voient le jour et sont évaluées (*exemple* : Metformine® avec la Cytarabine) (Figure 34)[170].

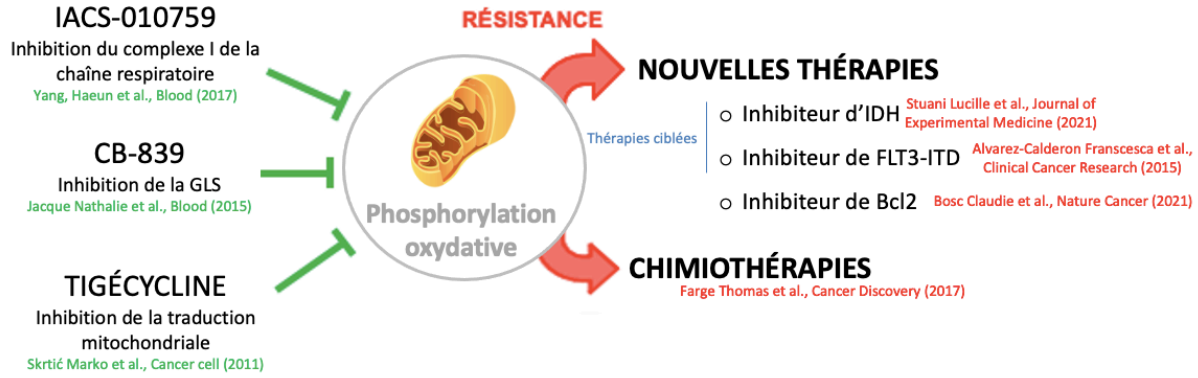

Figure 34: Lien entre la phosphorylation oxydative et la LAM[12,13,16,85,168,171,172]

La mitochondrie est une actrice centrale du métabolisme des cellules d'où son rôle majeur dans la réponse aux traitements dans les LAM. Ainsi, développer des molécules pour atteindre les

mitochondries des LAM, en tant que cible thérapeutique directe, est aujourd'hui une approche envisagée comme le montrent les essais cliniques de phase I[173]. Les inhibiteurs de l'OxPhos augmentent aussi l'efficacité d'autres traitements conventionnels lorsqu'ils leurs sont associés, comme c'est le cas avec les inhibiteurs de tyrosine kinase FLT-3, avec les traitements de chimiothérapies ou avec les BH3-mimétiques. Ces travaux démontrent ainsi que l'activité métabolique mitochondriale soutient la résistance des LAM aux traitements et pourrait être considérée comme un biomarqueur potentiel pour prédire la réponse aux traitements. L'évaluation du métabolisme mitochondrial pourrait donc être une approche diagnostique complémentaire et pertinente pour aider le clinicien à faire des choix thérapeutiques parmi les nombreux traitements aujourd'hui disponibles. En ce sens, l'évaluation du métabolisme énergétique mitochondrial est possible selon la détermination de différentes caractéristiques des mitochondries.

IV. Évaluation du métabolisme énergétique mitochondrial

Aujourd'hui, différents auteurs ont décrit des techniques d'évaluation du métabolisme énergétique mitochondrial qui pourraient servir à développer cliniquement de nouveaux biomarqueurs pour la prédiction de la réponse aux traitements des patients atteints de LAM. Le paragraphe ci-dessous va recenser ces différentes méthodes qui mesurent et/ou évaluent l'ultrastructure mitochondriale, la masse mitochondriale, le potentiel de membrane, la consommation d'oxygène, l'acidité extracellulaire, le taux d'ATP, l'activité enzymatique, le profilage immuno-métabolique, le priming mitochondrial, la quantification de l'ADN mitochondrial (ADNmt), et la signature génique.

a) Ultrastructure et dynamique mitochondriale

Il existe différents types de microscopie utilisables au laboratoire pour évaluer l'ultrastructure et le dynamisme mitochondriale.

1) *Microscopie électronique (ME)*

Un microscope électronique utilise un faisceau d'électrons pour illuminer un échantillon et en créer une image agrandie. L'étude détaillée de la mitochondrie fait appel au microscope électronique en transmission (MET) qui possède une bien meilleure résolution. En effet, le MET donne des informations structurelles sur des cellules ou des tissus fixés. Ainsi, les mitochondries sont classiquement étudiées au MET, permettant de les visualiser individuellement. L'avantage de celui-ci est l'observation détaillée de la morphologie des

mitochondries notamment de leurs tailles et de leurs crêtes, avec une résolution maximale. Chaque méthode présente cependant des limites, à savoir, par exemple, que ces observations n'indiquent aucune information fonctionnelle. Il faut savoir que les mitochondries sont organisées dans un réseau connecté dynamique au sein des cellules, s'adaptant constamment aux exigences cellulaires en modifiant leur forme et leur position par fission et fusion. Les connaissances acquises au cours de la dernière décennie montrent que cette dynamique joue un rôle crucial dans de nombreux processus tels que la bioénergétique mitochondriale, la production d'ERO et l'apoptose. De manière ancestrale, la MET était faite au Nitrate d'Argent sous forme de coupe. Actuellement, il existe des techniques de ME en trois dimensions (Tomographie électronique), qui permet de recréer des volumes à l'échelle nanométrique à l'aide d'un MET.

2) *Microscopie fluorescente confocale / Time-laps*

Outre la microscopie électronique, la microscopie fluorescente confocale peut être un autre recours. En effet, le réseau mitochondrial, c'est-à-dire l'existence de la mitochondrie dans un état fragmenté ou réticulaire peut être observé par microscopie fluorescente confocale et la dynamique mitochondriale (fusion/fission) par microscopie time lapse. Cette technique nécessite l'utilisation des marqueurs fluorescents tels que le MitoTracker Green, MitoSOX, TMRM également utilisable en CMF (cf page 82).

b) Production d'ATP

Il est possible de quantifier le taux d'ATP intracellulaire afin de mesurer l'activité mitochondriale. Pour doser l'ATP intracellulaire, des tests bioluminescents peuvent être utilisés tels que le Cell Titer Glo® (Promega). Le principe de cette technique se fonde sur la réaction luciférase, ATP dépendante. En effet, la luciférase en présence d'ATP, cofacteur de la réaction, entraîne la réduction de son substrat, la luciférine en oxyluciférine (Figure 35). Celui-ci produit une lumière mesurable. La quantité de lumière émise est ainsi proportionnelle à la quantité d'ATP et donc au nombre de cellules vivantes contrairement aux cellules mortes qui, elles, perdent cette capacité de réaction enzymatique. Par conséquent, cette technique n'est qu'un reflet de l'activité mitochondriale en mesurant l'ATP produit par le métabolisme mitochondrial et le métabolisme glycolytique. Donc il convient d'utiliser des inhibiteurs spécifiques, de la glycolyse ou de la mitochondrie, pour évaluer la contribution de chacune des voies métaboliques[174].

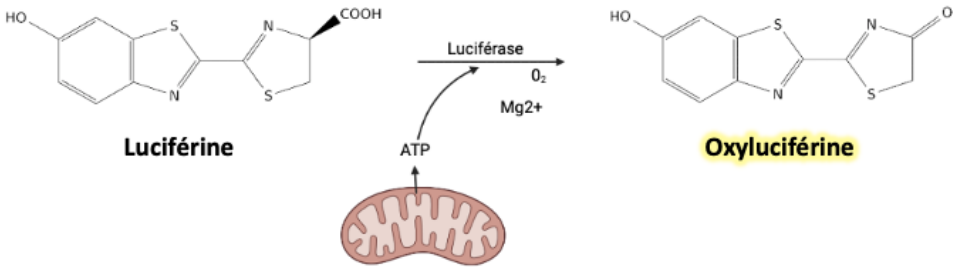

Figure 35: Mécanisme d'action de la luciférine

c) *Single Cell ENergetIc metabolism by profilIng Translation* inhibition (*SCENITH*)

Le single-cell energetic metabolism by profiling translation inhibition (SCENITH) est un acronyme pour une technique évaluant le métabolisme énergétique unicellulaire en profilant l'inhibition de la traduction. Ainsi le SCENITH permet l'étude des réponses métaboliques dans plusieurs types cellulaires en parallèle de la CMF.

Cette méthode se base sur le fait qu'environ la moitié de l'énergie totale produite par les cellules de mammifères en dégradant le glucose, les acides aminés et/ou les lipides est immédiatement consommée par la machinerie de synthèse des protéines[175,176]. C'est pourquoi le coût énergétique associé à ce processus métabolique offrait une opportunité méthodologique pour déterminer les niveaux de la synthèse des protéines en tant que mesure de l'activité métabolique globale. Cette dernière sera établie à l'aide de l'incorporation de la puromycine, un antibiotique nucléosidique qui inhibe la biosynthèse des protéines en mimant l'extrémité 3' d'un aminoacy-ARNt, ce qui provoque l'arrêt anticipé de la traduction de l'ARN messager par le ribosome, combinée à un nouvel anticorps monoclonal anti-puromycine, détecté par de l'immuno-fluorescence directe[177].

Le principe est donc d'incuber un échantillon de sang donné avec des inhibiteurs spécifiques des voies métaboliques tel que l'Oligomycine, qui inhibe le complexe F_0-F_1 ATP synthase, qui lui-même phosphoryle l'ADP en ATP en utilisant le gradient électrochimique de protons, ou le 2-Désoxy-d-Glucose ou 2DG, qui est une molécule de glucose dont le groupement hydroxyle en position 2 est remplacé par de l'hydrogène, inhibant ainsi la glycolyse. Ainsi, si une population cellulaire est énergétiquement dépendante de la voie métabolique inhibée, sa concentration en ATP chutera, et par conséquent ses niveaux de synthèse des protéines également (Figure 36).

Chaque technique présente des avantages et des inconvénients par rapport aux autres. Cette technique permet de distinguer 2 sous populations cellulaires présentes dans un même échantillon, mais mesure l'activité métabolique de façon indirecte, basée sur la synthèse protéique.

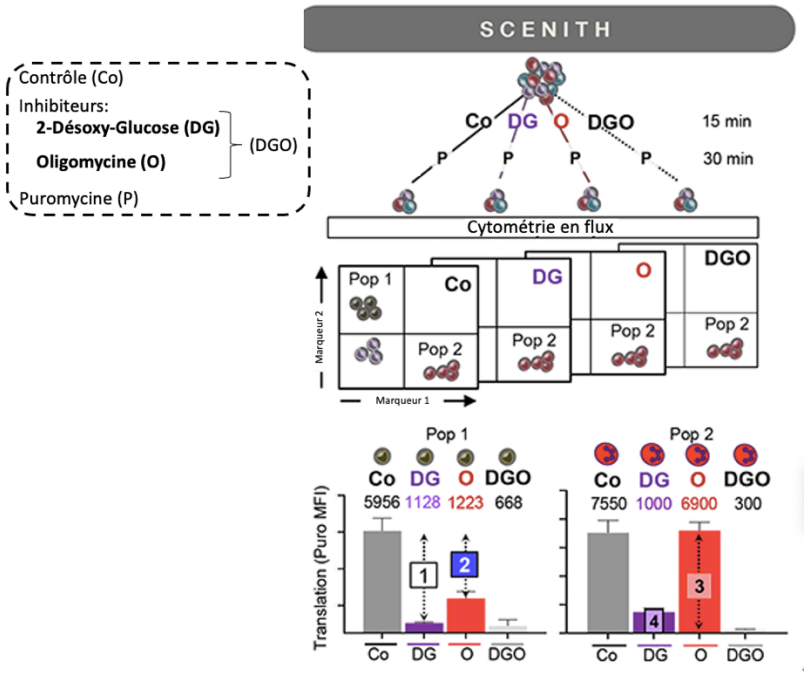

Figure 36: Principe de la technique SCENITH (O, Oligomycine ; Co, Contrôle ; DG, 2-Désoxy-Glucose ; P, Puromycine ; Pop, Population)

d) Sondes fluorescentes utilisables en cytométrie en flux

Les progrès technologiques associés à l'émergence de sondes fluorescentes permettent d'étudier les mitochondries et leurs activités sans altérer l'intégrité des cellules, aussi bien par CMF que par imagerie. Il existe de nombreuses sondes fluorescentes, qui possèdent des caractéristiques particulières. En effet, certaines sondes sont sensibles aux variations du potentiel membranaire alors que d'autres répondent à la présence ERO.

1) *Potentiel de membrane mitochondriale*

Le potentiel de membrane mitochondriale généré par des pompes à protons, sur les complexes I, III et IV de la chaîne respiratoire, est un composant essentiel dans le processus de stockage d'énergie pendant la phosphorylation oxydative. En effet, le gradient des protons provoqué par la chaîne respiratoire mitochondriale et la distribution asymétrique des protons de part et d'autre de la MMI créent un gradient chimique et un gradient électrochimique élevés entre l'espace inter-membranaire et la matrice. Cette différence de potentiel est essentielle pour maintenir la fonction physiologique de la chaîne respiratoire (production d'ATP) et le contrôle de la

perméabilité membranaire mitochondriale[178]. Une perte importante du potentiel de membrane mitochondriale vide les cellules de leur énergie, entrainant une mort subséquente. C'est pourquoi, la mesure du potentiel de membrane est largement utilisée pour caractériser l'activité métabolique mitochondriale et la mort cellulaire à un stade précoce[179]. Il faut savoir que le potentiel de membrane mitochondriale peut varier de -110-210 mV. Différentes sondes fluorescentes en CMF peuvent être utilisées pour déterminer le potentiel de membrane mitochondriale (Tableau 4). Ces sondes fluorescentes sont répertoriées en plusieurs familles :

- *Les Rhodamines :* Rhodamine 123, TMRE, TMRM
- *Les Carbocyanines :* JC-1, JC-9, JC-10, DiOC6(3)
- *Les Rosamines :* Mitotrackers dont Orange, Red

Tableau 4 : Les différentes sondes de potentiel de membrane et leurs caractéristiques

Rosamines	
Les mitochondries actives présentent un signal de fluorescence plus fort que les mitochondries en apoptoses. Ces sondes cationiques s'accumulent et se localisent préférentiellement dans la matrice mitochondriale grâce au potentiel membranaire établit par l'équilibre de *Nernst* selon la formule suivante : V = -RT/ZF ln (Ci/Co) où V le potentiel membranaire, R la constante de gaz, T la température, Z la charge ionique, F la constante de Faraday et Ci, Co les concentrations de sonde à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule respectivement. Puisque le potentiel théorique de la membrane plasmique est de -60 mV et celui de la membrane mitochondriale de -180 mV, il en résulte un différentiel de concentration de la sonde cationique entre les différents compartiments se traduisant par une accumulation d'un facteur 10 dans le cytosol et de 10 000 fois dans le compartiment mitochondrial. Du fait de cette accumulation, des précautions d'utilisation de ces sondes doivent être respectées, concernant la concentration limite au-delà de laquelle un quenching de fluorescence peut se produire mais également à une redistribution de la sonde dans les différents compartiments (cytosol et mitochondries), suite à la réversibilité de l'équilibre de Nernst lorsque le milieu d'incubation est remplacé par un milieu dépourvu de sonde	
MitoTracker® Deep Red FM	- Permet de marquer et de localiser les mitochondries dans les cellules vivantes. - Fluorescence Ex/Em (nm) : 644/665 (rouge/violet).
MitoTracker® Red FM	- Colore la mitochondrie dans les cellules vivantes. Son accumulation dépend du potentiel de la membrane. - Fluorescence Ex/Em (nm) : 581/644 (rouge/violet).
Mitotracker™ Red = CMXRos	- Fluorophores cationiques, qui s'accumulent dans les mitochondries proportionnellement au potentiel membranaire mitochondrial hautement négatif (-250 mV). - Fluorescence Ex/Em (nm) : 579/599 (rouge).
MitoTracker Orange = CMTMRos	- Colorant orange fluorescent qui colore les mitochondries dans les cellules vivantes et dont l'accumulation dépend du potentiel de la membrane. - Fluorescence Ex/Em (nm) : 550/580 (orange).
Carbocyanines	

Les mitochondries actives présentent un signal de fluorescence rouge plus vif que les mitochondries à faible potentiel membranaire qui fluorescent en vert. En effet, ces sondes cationiques s'accumulent et se localisent préférentiellement dans la matrice mitochondriale grâce au potentiel membranaire établit par l'équilibre de Nernst.	
JC-1	- Colorant cationique lipophile, qui s'accumule dans les mitochondries, permettant l'évaluation du potentiel de membrane. - Dans les cellules saines, la charge négative résultant du potentiel de la membrane mitochondriale intacte facilite l'accumulation de JC-1 dans la matrice mitochondriale. Monomère/vert : 514/529nm Agrégat/rouge : 514/590nm
JC-9	- Colorant cationique lipophile, qui s'accumule dans les mitochondries, permettant l'évaluation du potentiel de membrane. Monomère/vert : 514/529nm Agrégat/rouge : 514/590nm
JC-10	- Sonde qui se concentre dans la matrice mitochondriale où elle forme des agrégats fluorescents rouges. Cependant dans les cellules apoptotiques et nécrotiques, JC-10 diffuse hors des mitochondries. Elle se transforme en forme monomère et colore les cellules en fluorescence verte. - Sonde ratiométrique dont les propriétés spectrales varient suivant son état : agrégé ou non agrégé. Lorsque des mitochondries sont polarisées et donc énergisées, la sonde JC-10 s'accumule dans la matrice mitochondriale puis forme des agrégats. - Cette sonde est de meilleure solubilité en milieux aqueux que JC-1 et JC-9. Monomère/vert : 514/529nm Agrégat/rouge : 514/590nm
DiOC2(3)	*= 3,3'-Diethyloxacarbocyanine Iodide* - Permet la visualisation du potentiel de membrane. Monomère/vert : 485/497nm Agrégat/rouge : 485/650nm
DiOC6(3)	*= 3,3'-Dihexyloxacarbocyanine Iodide* - Colorant lipophile vert-fluorescent, perméable aux cellules, qui est sélectif pour les mitochondries des cellules vivantes, lorsqu'il est utilisé à des faibles concentrations. A des concentrations plus élevées, le colorant peut être utilisé pour colorer d'autres membranes internes, telles que le RE. Monomère/vert : 485/497nm Agrégat/rouge : 485/650nm
Rhodamines	
TMRE	*= Tetramethylrhodamine ethyl ester* - Colorant cationique orange, perméable aux cellules, qui s'accumule dans les mitochondries.

	- Fluorescence Ex/Em (nm) : 549/575 (rouge/orangé)
TMRM	*= Tetramethylrhodamine methyl ester* - Colorant fluorescent rouge-orange perméable aux cellules, cationique et facilement séquestré par les mitochondries actives. - Fluorescence Ex/Em (nm) : 549/575 (rouge/orangé)

Cette technique présente cependant des limites. En effet, une question se pose sur la sensibilité des sondes, qui ne sont peut-être pas assez sensibles aux faibles variations. De plus, ces sondes sont influencées par la masse mitochondriale des cellules.

Il a été montré dans la littérature que l'activité de la mitochondrie était augmentée dans les cellules leucémiques. C'est pourquoi, le potentiel de membrane est également augmenté[180]. Récemment, *Hlozkova et al.,* ont évalué le potentiel de membrane mitochondriale sur différents types de lignées cellulaires de leucémies humaines d'origines différentes dont des LAM à l'aide de la fluorescence du TMRE afin de mieux comprendre son lien avec la sensibilité sélective de la L-asparaginase (ASNase). Les résultats ont montré que les lignées cellulaires avec une fluorescence TMRE plus élevée ont en général une sensibilité plus faible à l'ASNase[181].

2) *Masse mitochondriale*

Il faut savoir que la masse mitochondriale est le reflet de plusieurs événements :

- La biogénèse mitochondriale qui dépend de facteurs de transcriptions comme PPARg coactivateur 1 alpha (PGC1-alpha), facteur de transcription mitochondrial A (TFAM) et facteur respiratoire nucléaire (NRF).
- Les mécanismes de fusion/fission. Ce dynamisme mitochondrial ne va pas modifier la masse mitochondriale mais va permettre de visualiser le réseau mitochondrial. Par exemple, la fusion est un phénomène favorable pour les cellules avec une OxPhos importante.
- La mitophagie avec les protéines comme PINK ou PARKIN.

Il existe des sondes structurelles, qui sont liées uniquement à la masse mitochondriale. On peut déterminer la masse mitochondriale avec le MitoTracker Green®. En effet, cette sonde fluorescente en CMF sélective à la mitochondrie, se lie de manière covalente aux protéines mitochondriales en réagissant avec les résidus cystéine, entrainant une accumulation dans la matrice mitochondriale.

Grâce à l'affinité de cette sonde envers un composant spécifique des mitochondries, l'intensité de fluorescence des cellules marquées est proportionnelle à leur contenu en mitochondries, ce qui permet donc d'évaluer la masse mitochondriale[182].
Cependant, des variations d'intensité peuvent résulter de modifications de l'état métabolique ou d'organisation et de forme des mitochondries et non de variations de la masse mitochondriale. Par ailleurs, ce marquage peut être influencé par des modifications de potentiel[183]. En effet, le marquage par le Mitotracker Green® nécessite une polarisation des mitochondries pour que la sonde entre dans ce compartiment. Si les mitochondries sont inactives, dépolarisées ou découplées, le Mitotracker Green® ne pourra pas atteindre son site de fixation dans les mitochondries, ce qui implique que le Mitotracker Green® ne pourra pas être réalisé sur des cellules fixées.

Comme rapporté précédemment, des publications ont montré que l'activité de la mitochondrie est augmentée dans les cellules leucémiques, entrainant une masse mitochondriale plus importante dans les cellules de patients leucémiques[168,180,184].

3) *Espèces réactives de l'oxygène = ERO*

Il faut savoir que les mitochondries sont considérées comme principales sources d'ERO dans les cellules. En effet, le fonctionnement de la chaîne respiratoire est non seulement associé à la synthèse d'ATP mais aussi à la production de radicaux libres oxygénés. Ces radicaux sont issus de la fixation sur l'oxygène d'électrons s'échappant des complexes de la chaîne respiratoire. Le produit de cette réaction est l'anion superoxyde (O_2^-), toxique pour les constituants de la mitochondrie. L'anion superoxyde, espèce radicalaire de l'oxygène, présente un électron célibataire, le rendant très peu stable. La mitochondrie produit de façon normale de très faible quantité de ces radicaux (2 à 5% de l'oxygène va être partiellement réduit et échappe ainsi à la chaîne respiratoire pour former des ERO). C'est pourquoi, il est intéressant de mesurer les ERO pour évaluer le métabolisme mitochondrial.
La production d'ERO mitochondriaux peut être mesurée à l'aide de la sonde MitoSOX par CMF. Le MitoSOX est une association de 2 molécules chimiques, c'est-à-dire, le TPP+, qui est une molécule cationique et lipophile qui amène la sonde fluorescente vers la mitochondrie et un dérivé cationique du dihydroéthidium, conçu pour être un indicateur de haute sélectivité du superoxyde dans les mitochondries des cellules vivantes. En effet, le dihydroéthidium est oxydé rapidement par superoxyde et non par d'autres dérivés réactifs de l'oxygène (Figure 37). Cette

oxydation par superoxyde produit une fluorescence rouge (Ex : 510nm / Em : 580nm), qui permettra d'évaluer le métabolisme mitochondrial.

L'article de *Sriskanthadevan et al*., a d'ailleurs évalué le niveau d'ERO via la sonde MitoSOX sur des échantillons de cellules saines et leucémiques. Les résultats montrent que les cellules LAM primaires sont plus sensibles à la production d'ERO induite par la roténone par rapport aux cellules hématopoïétiques normales, contrairement à l'induction par l'Antimycine où les cellules hématopoïétiques normales sont plus sensibles à la production d'ERO mitochondriale[184].

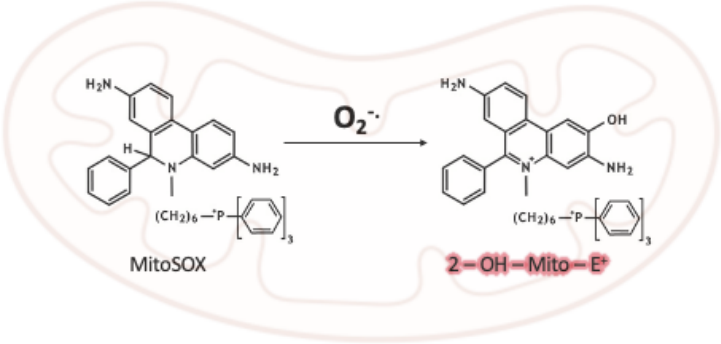

Figure 37: Mécanisme d'action du MitoSOX

Il existe d'autres techniques de mesure des ERO, cependant elles ne sont pas toutes spécifiques aux ERO mitochondriaux et/ou à l'anion superoxyde. En effet, la membrane mitochondriale est semi perméable, permettant à l'anion superoxyde de se diffuser et de se retrouver dans le cytosol. Cependant comme expliqué précédemment, l'anion superoxyde présente une demi-vie très brève du fait de l'électron célibataire. Celui est rapidement pris en charge par les superoxyde dismutase (SOD), qui vont alors le transformer en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), molécule très stable. Ainsi, la réaction catalysée est : $\boldsymbol{2O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2}$.

Chez l'Homme, il y a trois formes de SOD qui coexistent. Parmi les trois, il y a deux types de CuZn-SOD, soit le SOD1 qui est une protéine dimérique présente dans le cytoplasme et l'espace intermembranaire mitochondrial, soit le SOD3 qui est une protéine extracellulaire tétramérique. La troisième forme est le SOD2, Mn-SOD, situé dans la matrice mitochondriale et sur la paroi interne des mitochondries. Ici, vu que l'on s'intéresse aux ERO mitochondriaux, il faut bien prendre en compte l'implication des SOD mitochondriaux.

Ainsi, les ERO peuvent être également mesurées avec une sonde fluorogène, le H_2DCFDA, diacétate de dichlorodihydrofluorescéine. Celui-ci, perméant aux cellules, est une forme chimique réduite de fluorescéine, utilisée comme indicateur des ERO dans les cellules. Après

diffusion dans la cellule, les groupes acétyle sur H_2DCFDA sont clivés par l'estérase intracellulaire pour donner le composé non fluorescent qui est rapidement oxydé par les ERO en 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine (DCF), hautement fluorescente (Figure 38). L'intensité de fluorescence est proportionnelle aux niveaux des ERO dans le cytosol cellulaire.

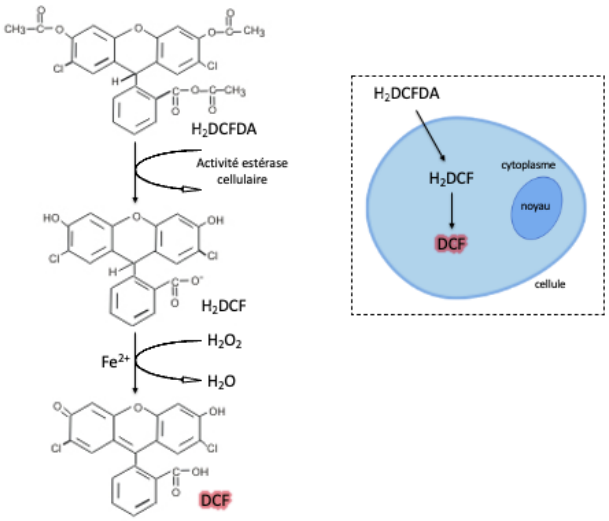

Figure 38: Mécanisme d'action du H_2DCFDA

Les ERO peuvent être détectées et quantifiées également par le réactif CellRox. C'est une nouvelle sonde fluorogénique permettant de mesurer le stress oxydatif dans les cellules vivantes. Perméant aux cellules, il est faiblement fluorescent à l'état réduit. Il affiche une fluorescence lors de l'oxydation par des ERO.

Le dihydroethidium (DHE) peut être dosé afin de mesurer les ERO directement dans les cellules vivantes. Le DHE est utilisé comme une sonde fluorescente pour la détection de la génération des ERO et il est spécifique à l'O_2^- et au H_2O_2. En effet, le DHE présente une fluorescence bleue dans le cytosol jusqu'à ce qu'il soit oxydé, moment auquel il s'intercale dans l'ADN de la cellule, colorant son noyau d'une fluorescence rouge. Le DHE est la forme réduite du bromure d'éthidium, colorant de l'ADN, qui est capable de se diffuser passivement dans les cellules. Lors de sa réaction avec l'O_2^-, le DHE forme un produit fluorescent rouge, le 2-hydroxyéthidum.

Des travaux dans les cancers solides ont mis en évidence qu'une activité défectueuse de la chaîne respiratoire augmentait la production d'ERO. Ces ERO favorisent la prolifération et la métastase des cancers[185,186].

Ces différentes techniques de sondes fluorescentes (masse mitochondriale, potentiel de membrane, ERO) peuvent s'effectuer par l'intermédiaire de la CMF comme vu précédemment.

Donc, en plus des inconvénients propres à chacune de ces techniques, elles présentent des inconvénients liés à cet appareil. Par exemple, en CMF, les expériences utilisent une densité cellulaire importante.

e) Consommation d'oxygène

Il est également possible d'avoir recours à une analyse fonctionnelle du métabolisme mitochondrial, en passant par la mesure de la consommation d'oxygène. La quantité totale d'oxygène consommé par les mitochondries des LAM ne représente cependant qu'une image partielle du fonctionnement de leur OxPhos. En effet, l'OxPhos est un processus biologique qui associe la phosphorylation de l'ATP à partir d'ADP et de Phosphate inorganique au fonctionnement de la chaîne respiratoire (qui consomme l'oxygène). Mais il existe plusieurs enzymes qui consomment de l'oxygène dans une cellule tels que le cytochrome c oxydase mitochondriale, mais aussi les NADPH oxydases, les xanthines oxydases, les cyclooxygénases,… C'est l'utilisation d'inhibiteurs appropriés qui permet de faire le lien entre consommation d'oxygène et phosphorylation oxydative mitochondriale. Deux types de technologie sont basées sur la mesure de la quantité d'oxygène dissous dans le milieu extracellulaire : La mesure polarographique à l'aide d'une électrode de Clark (*exemple :* Oroboros O_2k) et la mesure par fluorimètrie (*exemple :* Seahorse XFe24).

1) *Électrodes de Clark*

La polarographie est une méthode de détection électrochimique permettant de détecter la quantité d'oxygène dissous grâce à la mesure de la courbe courant-potentiel, polarisée entre 2 électrodes au cours d'une électrolyse. Elle représente le *« gold standard »* en termes d'oxygraphie. Fondée sur la mesure de la quantité d'oxygène dissous dans le milieu extracellulaire, l'Oroboros, qui est constitué des électrodes de Clark, reste la technique de référence. 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[187]. L'électrode de Clark est composée d'une cathode en platine polarisée à -0,6 V et d'une anode en argent reliées par un électrolyte (KCl 3M) et séparées du milieu de culture où baignent les cellules par une membrane semi-perméable par laquelle diffuse l'oxygène. Dans ces conditions, les molécules d'oxygène présentes dans la cuve de mesure diffusent à travers la membrane et sont réduites à la cathode selon la réaction suivante : $\boldsymbol{O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O.}$

La réaction d'oxydation qui se produit de manière concomitante au niveau de l'anode est :

$$4Ag + 4Cl^- \rightarrow 4AgCl + 4e^-.$$

Ainsi on a une équation bilan de la réaction équivalente :

$$4Ag + 4Cl^- + O_2 + 4H^+ \rightarrow 4AgCl + 2H_2O.$$

Entraînant ainsi la génération d'un courant proportionnel à la concentration d'oxygène dissous dans le milieu (Figure 39). Dans ce contexte, la variation de courant induit est directement proportionnelle à la concentration d'oxygène dissous dans le milieu d'incubation. En effet, le nombre d'électrons que les électrodes s'échangent dépend de l'oxygène, où plus on a d'oxygène, plus le courant est fort.

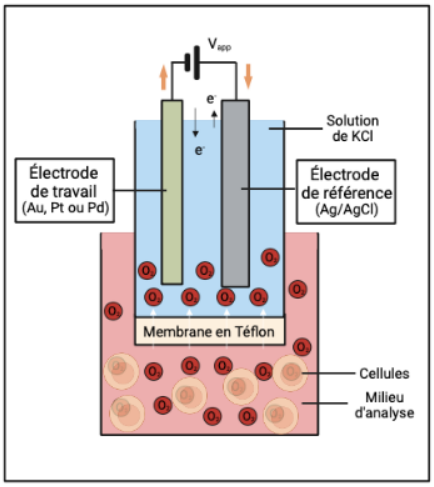

Figure 39: Schéma de l'électrode de Clark

Cependant les mitochondries ne sont pas les seules à consommer de l'oxygène : les NOS, les prolyl hydroxylases,… D'où la consommation d'oxygène mitochondriale est déterminée en utilisant différents substrats et/ou inhibiteurs de la chaine respiratoire.

- L'Oligomycine inhibe le complexe F_0-F_1 ATP synthase, qui phosphoryle l'ADP en ATP en utilisant le gradient électrochimique de protons. Ainsi, l'inhibition de l'ATP synthase, inhibe toute l'activité de la chaine respiratoire lié à la phosphorylation de l'ADP.
- Le FCCP, protonophore, qui fait rentrer des protons dans la matrice mitochondriale, ce qui mime une demande d'ATP, entraine une accélération de la chaine respiratoire afin de maintenir le gradient de proton. Il faut savoir qu'à chaque injection, on augmente la consommation d'oxygène, jusqu'à saturation.
- La Roténone et l'Antimycine A, permettent d'éliminer totalement la consommation d'oxygène par les complexes respiratoires, en inhibant respectivement le complexe I et le complexe III.

Il faut être conscient des avantages et inconvénients de chaque instrument. L'Oroboros présente des avantages comme de travailler sur des cellules en suspension et également de faire de

multiples injections d'inhibiteurs. Cependant, les électrodes de Clark ne permettent d'analyser qu'un faible nombre d'échantillons (2 ou 3) à la fois et ne peuvent pas mesurer simultanément l'acidification extracellulaire relative à l'activité glycolytique des cellules, comme c'est le cas pour le Seahorse®.

Dans son article, *Erdem et al.*, ont également utilisé l'Orobosos comme technique pour mettre en évidence une adaptabilité métabolique des cellules cancéreuses dans une cohorte de patients atteints de LAM FLT3-ITD+. Ainsi, par l'intermédiaire de l'Oroboros, il a été montré que l'inhibition de l'activité du complexe II de la chaîne respiratoire, entraine une réduction de la consommation d'oxygène dans les cellules FLT3-ITD+ et MOLM13 contrairement aux cellules FLT3-wt (wild type) et HL60[132].

2) *Fluorimètres*

i. Seahorse®

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. 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 dit de quenching. Un analyseur de flux extracellulaire en temps réel, comme le Seahorse® permet de détecter cette fluorimétrie[188].
Le Seahorse® peut analyser de manière automatisé semi-haut-débit simultanément 24 à 96 puits selon les machines, ce qui a permis d'analyser plusieurs conditions à la fois. Les fluorimètres (XFe Seahorse) sont aussi considérés aujourd'hui comme une alternative fiable et robuste pour quantifier la consommation d'oxygène de divers modèles. Le principe de cette technologie permet de créer une chambre hermétique contenant les cellules dans laquelle on détermine à l'aide de sondes fluorescentes à la fois le niveau d'oxygène dissous dans le milieu de culture et la quantité de protons libérés par les cellules (via la mesure du pH avec l'acidité extracellulaire). Avec la technologie Seahorse®, deux possibilités existent avec une plaque 24 puits ou 96 puits où se retrouveront les cellules dans leur milieu de culture ainsi qu'une cartouche (embarquant les sondes fluorescentes et 4 pores contenant les différents composés à injecter). La chambre peut se rouvrir pour la réoxygénation des cellules (et éviter l'hypoxie), ce qui maintient la quantité d'oxygène constante au moment de l'analyse. Comme précisé précédemment, autour de l'électrode, on a 4 petits réservoirs pour contenir des inhibiteurs. Ainsi, différentes

composantes du métabolisme de l'OxPhos peuvent être caractérisées à l'aide d'inhibiteurs. En effet, la consommation d'oxygène des mitochondries mesurée instantanément est naturellement liée à la demande énergétique et à la quantité d'ATP disponible au moment de la mesure. La capacité des cellules à augmenter rapidement leur phosphorylation oxydative pour faire face à une demande urgente en ATP n'est pas appréhendable sur la base de cette seule consommation d'oxygène dite « basale ». Il convient alors d'utiliser des substances pharmacologiques protonophores comme le FCCP pour mimer une demande énergétique soudaine et déterminer la capacité des cellules à atteindre la consommation d'oxygène maximale qu'elles sont susceptibles d'atteindre. Cette valeur est définie comme la « capacité de réserve mitochondriale » (ou SRC pour Spare Reserve Capacity)[189].

L'expérience se déroule de la manière suivante : On réalise 3 mesures en absence d'inhibiteur afin de mesurer la consommation basale en oxygène (exprimé en pmol d'O_2.min^{-1}). Puis, on injecte l'Oligomycine, qui va inhiber le complexe F_0-F_1 ATP synthase, qui phosphoryle l'ADP en ATP en utilisant le gradient électrochimique de protons. Ainsi, l'inhibition de l'ATP synthase, empêche toute l'activité de la chaine respiratoire liée à la phosphorylation de l'ADP, entraînant ainsi une chute de la consommation d'oxygène. La différence entre la consommation d'oxygène basale et la consommation résiduelle, permet de mesurer la consommation d'oxygène dépendante de la synthèse d'ATP, aussi appelé ATP Turnover. On injecte ensuite le FCCP, protonophore permettant de faire rentrer des protons dans la matrice mitochondriale et de mimer une demande d'ATP, entrainant une accélération de la chaine respiratoire afin de maintenir le gradient de proton. En réponse au FCCP, l'activité de la chaine respiratoire augmente, ce qui entraîne une augmentation de la consommation d'oxygène jusqu'à atteindre un pic, définissant alors la consommation d'oxygène maximale. Le ratio de la consommation d'oxygène maximale et de la consommation d'oxygène basale permet de mesurer la capacité de réserve mitochondriale ou SRC, qui caractérise la capacité d'accélération de la chaine respiratoire face à un stress énergétique.

Une problématique technique pour la mesure de la SRC réside dans le fait que si le FCCP n'est pas en concentration suffisante alors son effet sera minimisé et il ne permettra pas l'induction d'une consommation d'oxygène maximale. A l'inverse si la concentration en FCCP est trop élevée, cela déstabilise la membrane mitochondriale interne ce qui a pour conséquence de faire chuter la consommation d'oxygène. Il est ainsi nécessaire d'utiliser une gamme de concentration de FCCP afin d'atteindre la concentration de saturation.

Enfin, on ajoute l'association de l'Antimycine A (inhibiteur du complexe III) et de la Roténone (bloque le transfert des électrons vers le complexe I) afin d'inhiber totalement l'activité de la chaine respiratoire et permettre de définir les parts de l'OxPhos attribuées à la fuite de proton (dit proton leak) et à la respiration non-mitochondriale (Figure 40)[190].

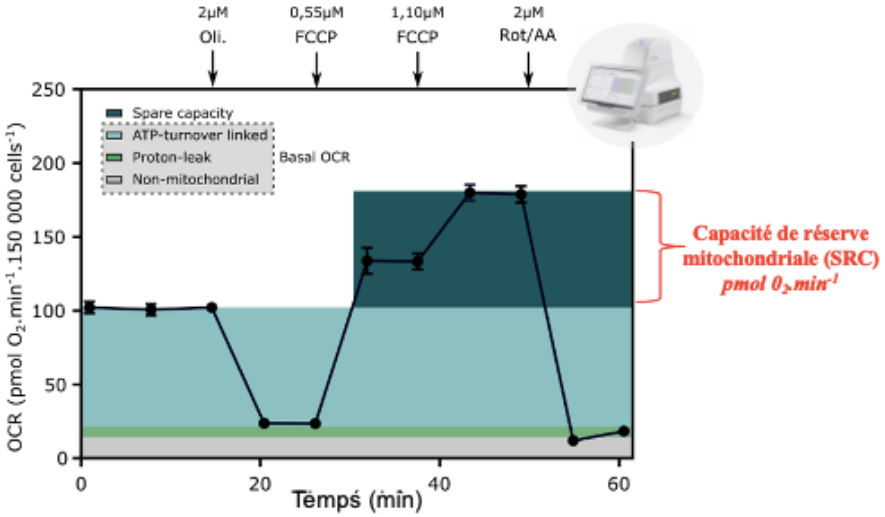

Figure 40: Mécanisme d'action du Seahorse®

À l'aide du Seahorse®, on mesure ainsi la quantité d'oxygène dissous dans le milieu par un protocole spécifique. Il permet également de mesurer l'acidification du milieu extracellulaire. La mesure de ces taux est réalisée directement, permettant d'avoir une véritable valeur de l'activité métabolique. Cette technique peut également permettre de mesurer la flexibilité métabolique.

ii. MitoXpress

Une autre méthode permet d'évaluer la consommation d'oxygène par fluorimétrie, le MitoXpress®. Contrairement au Seahorse®, le MitoXpress® mesure la consommation d'oxygène dans des puits où l'on retrouve : les cellules à analyser, la sonde fluorescente qui permet de mesurer la consommation d'oxygène et enfin une couche de gras permettant de fermer la chambre d'analyse dans les puits. Les cellules ne vont pas être ré-oxygénée pendant l'expérience. Ce test de fluorescence à résolution temporelle est fondé sur la capacité de l'oxygène à éteindre l'état excité de la sonde. Ainsi, les modifications de la consommation d'oxygène reflètent les modifications de l'activité mitochondriale par l'intermédiaire des modifications du signal de la sonde MitoXpress® au fil du temps.

Cependant la mesure de la consommation d'oxygène par les différentes de fluorimétrie présente des limites :

- L'étude par oxymétrie de la consommation d'oxygène se réalise sur un modèle fondé sur l'utilisation du FCCP. Cependant, il est possible que le FCCP fasse rentrer un nombre de protons plus élevé que ne pourrait le faire toutes les ATP synthases en fonctionnement. Ainsi la consommation maximale d'oxygène dans ce modèle est possiblement surévaluée.
- La capacité de réserve mitochondriale est mesurée dans un contexte où la F_0-F_1 ATP synthase est inhibée par l'Oligomycine, c'est-à-dire en absence de synthèse d'ATP mitochondriale. On se retrouve alors dans un contexte éloigné des mécanismes physiologiques.
- La consommation d'oxygène est mesurée sur des échantillons de patients post-ficoll, donc on n'est pas sur un échantillon purement blastique, celui-ci est contaminé par la présence de certaines cellules saines.
- La dernière limite est que celles-ci mesurent une moyenne de l'activité métabolique. Par exemple, dans un échantillon de cellules, il peut y avoir plusieurs sous-types de cellules, certaines actives métaboliquement contrairement à d'autres moins actives métaboliquement. Ainsi, la fluorimétrie va donner une moyenne des activités métaboliques de ces sous-populations sans pouvoir les distinguer.

f) Quantification de l'ADNmt

La mitochondrie possède son propre génome. L'ensemble de l'ADNmt code pour 37 gènes dont 13 gènes vont être traduit en protéines présentes au niveau de la MMI, les autres gènes codent pour des ARNt et des ARN ribosomaux. Ainsi une évaluation de la quantité de mitochondries permet de refléter le métabolisme mitochondrial. Celle-ci peut être étudiée, par une quantification d'un fragment d'ADN mitochondrial grâce à une PCR quantitative (qPCR) en temps réel. La qPCR est une méthode particulière de réaction en chaîne par polymérase permettant de mesurer la quantité initiale d'ADN présente dans un échantillon donné. Diverses publications ont ainsi montré que la quantité d'ADN mitochondrial était plus importante dans la LAM[180,191].

L'autre possibilité consiste à analyser l'expression de plusieurs transcrits codés par l'ADNmt dont l'expression relative mesuré en qRTPCR est proportionnelle à la quantité d'ADNmt. *Sriskanthadevan et al. (2015),* ont évalué le nombre de copies d'ADNmt par RT-PCR entre les

cellules hématopoïétiques normales et les échantillons primaires de LAM et ont abouti à la même conclusion[184].

g) Signature de gènes codant pour des protéines mitochondriales

La transcriptomique regroupe un ensemble de techniques (RNAseq, Microarray) permettant une analyse quantitative relative des ARN. Il faut être conscient que dans le cas des gènes codant pour des protéines mitochondriales, la plupart des transcrits sont d'origine nucléaire mais qu'un petit nombre est aussi codé par le génome mitochondrial.

Ces résultats de transcriptomique vont permettre de déterminer dans chaque population l'enrichissement des gènes liés au métabolisme mitochondrial (analyse GSEA). Le GSEA *(«Gene SET Enrichment Analysis »)* est une analyse bio-informatique qui interprète les données d'expression génique, en se concentrant sur des ensembles de gènes, c'est-à-dire des groupes de gènes partageant une fonction biologique, une localisation chromosomique ou une régulation commune. On peut alors identifier si un ou un ensemble de gènes est sur- ou sous-représenté. De la même manière, la limite de cette méthode est que l'expression des gènes n'est pas systématique au niveau du phénotype.

h) Activités enzymatiques des complexes de la chaîne respiratoire

À l'aide des techniques spectrophotométriques, il est possible d'analyser les activités de chaque complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale. L'activité enzymatique de chaque complexe de la chaine respiratoire peut être dosée par des techniques d'enzymologie en spectrophotométrie. Le principe des dosages des complexes repose sur le transfert d'électrons d'un donneur à un accepteur. La spectrophotométrie va alors mesurer soit la vitesse d'apparition d'un accepteur réduit, soit la disparition d'un donneur oxydé, afin de quantifier l'activité enzymatique. Ces tests fournissent une estimation quantitative simple des activités enzymatiques spécifiques en suivant les densités optiques des différentes enzymes correspondant aux complexes dont on veut mesurer l'activité en présence de leurs substrats et/ou inhibiteurs spécifiques. Ces tests reposent sur des protocoles standardisés des mitochondriopathies[192,193].

- Complexe I

Ce complexe catalyse la réaction enzymatique :

$$\boldsymbol{NADH + H^{+} + ubiquinone \rightarrow NAD^{+} + ubiquinol}$$

Le dosage de l'activité de ce complexe se fait en de mesurant l'oxydation du NADH, dont l'absorbance est mesurée à 340nm, en présence d'un analogue de l'ubiquinone, le

décylubiquinone (même noyau aromatique mais la chaîne latérale est beaucoup plus courte, donc moins hydrophobe). On utilise cet analogue car l'ubiquinone est une molécule très hydrophobe, entrainant des problèmes de solubilisation dans un dosage enzymatique comme celui-ci (Figure 41).

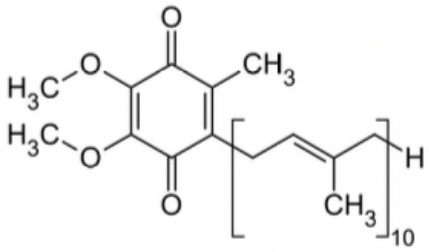

Figure 41: Structure chimique de l'Ubiquinone

Lors de la mesure spectrophotométrique, la diminution de l'absorbance à 340nm est proportionnelle à l'activité du complexe I. On suit alors la densité optique (DO) du NADH en présence ou non de roténone (inhibiteur spécifique du complexe I), afin d'obtenir l'activité d'oxydation du NADH spécifique du complexe I. En effet, il existe des activités NADH qui ne sont pas mitochondriale et donc insensible à la roténone, inhibiteur spécifique du complexe I de la chaîne respiratoire.

Erdem et al., ont récemment mis en évidence une adaptabilité métabolique des cellules cancéreuses en évaluant les signatures métaboliques dans une cohorte de patients atteints de LAM FLT3-ITD+. Pour arriver à cette conclusion, ils ont réalisé plusieurs expériences dont la mesure de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire. Celle-ci précise que les lignées cellulaires avec un métabolisme majoritairement OxPhos (MOLM13, MV411) présentent une activité du complexe I plus élevée que les cellules de la lignée glycolytique (FLT3-wt, HL-60, THP1, K562) (Figure 42)[132].

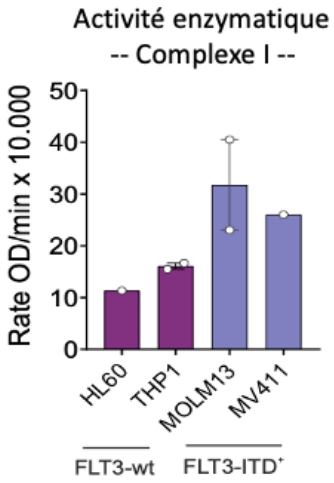

Figure 42: Activité enzymatique du complexe I de la chaîne respiratoire dans des cellules LAM, *d'après Erdem et al,.*[132]

- Complexe II

La Succinate déshydrogénase catalyse deux réactions enzymatiques successives :

succinate* + *FAD* → *fumarate* + *FADH2 et ***FADH2* + *ubiquinone* → *FAD* + *ubiquinol***

Le dosage du complexe II fait intervenir un composé chimique de couleur bleue, le dichlorophénolindophénol (DCPIP), qui absorbe la lumière à 600nm. On utilise ce réactif synthétique car le $FADH_2$ est produit à l'intérieur de l'enzyme et n'est donc pas mesurable. Ainsi, la décylubiquinone va transférer au cours de la réaction ses électrons au DCPIP. Lorsque ce composé est réduit par l'ubiquinol, il perd alors sa couleur bleue et n'absorbe plus la lumière (Figure 43). C'est pourquoi, lors de la mesure spectrophotométrique, la diminution de l'absorbance à 600nm est alors proportionnelle à l'activité du complexe II. Cette réaction est relativement spécifique donc il n'est pas nécessaire d'avoir un inhibiteur du complexe II comme le malonate.

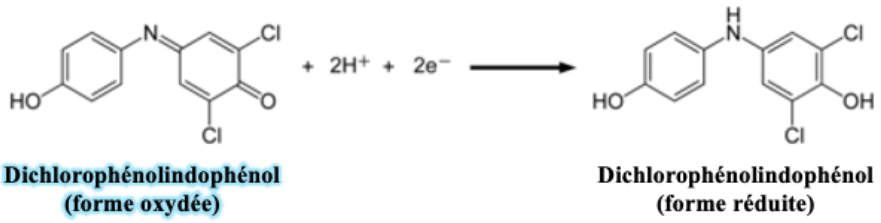

Figure 43: Mécanisme d'action du Dichlorophénolindophénol

De la même manière, *Erdem et al. (2022),* ont montré que les lignées cellulaires avec un métabolisme majoritairement OxPhos (MOLM13, MV411) présentaient une activité du

complexe II plus élevée que les cellules de la lignée glycolytique (FLT3-wt, HL-60, THP1, K562) (Figure 44)[132].

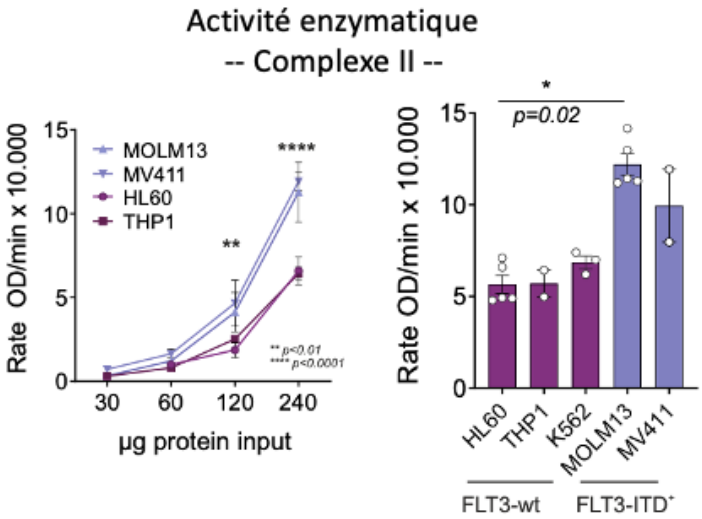

Figure 44: Activité enzymatique du complexe II de la chaîne respiratoire dans des cellules LAM, *d'après Erdem et al,.*[132]

- Complexe III

Le complexe III, quant à lui, catalyse la réaction suivante :

cytochrome c oxydé + ubiquinol → cytochrome c réduit + ubiquinone

On a donc une oxydation de l'ubiquinol en ubiquinone, entraînant le transfert des électrons au CytC (réduction du CytC). Le dosage repose sur la mesure de la réduction du CytC qui une fois réduit absorbe la lumière à 550nm. C'est pourquoi, on retrouve une proportionnalité entre l'augmentation de l'absorbance à 550nm et l'activité du complexe III. On suit ainsi la DO en présence ou non d'antimycine (inhibiteur spécifique du complexe III), afin d'obtenir l'activité de réduction du CytC spécifique du complexe III. En effet, il existe des activités non respiratoires qui induisent l'oxydation de l'ubiquinol, d'où l'intérêt d'utiliser un inhibiteur spécifique du complexe III. On peut ainsi mesurer l'activité de ce complexe en calculant la différence entre l'activité totale et celle résistante à l'antimycine A, mesurée en parallèle par un dosage en présence d'antimycine A.

Sriskanthadevan et al. (2015) ont mis en évidence un métabolisme mitochondrial dérégulé pour les cellules de LAM. Pour arriver à cette conclusion, ils ont réalisé plusieurs expériences dont la mesure de l'activité du complexe de la chaîne respiratoire entre des cellules saines et leucémiques. Dans celle-ci, il a été montré qu'il y avait une différence d'activité enzymatique des complexes I et II, mais pas des complexes III, IV et V de la chaîne respiratoire (Figure 45). En effet, l'activité enzymatique des complexes I et II était plus élevée dans les lignées

cellulaires LAM et les échantillons primaires de patients atteints de LAM par rapport aux cellules hématopoïétiques saines[184].

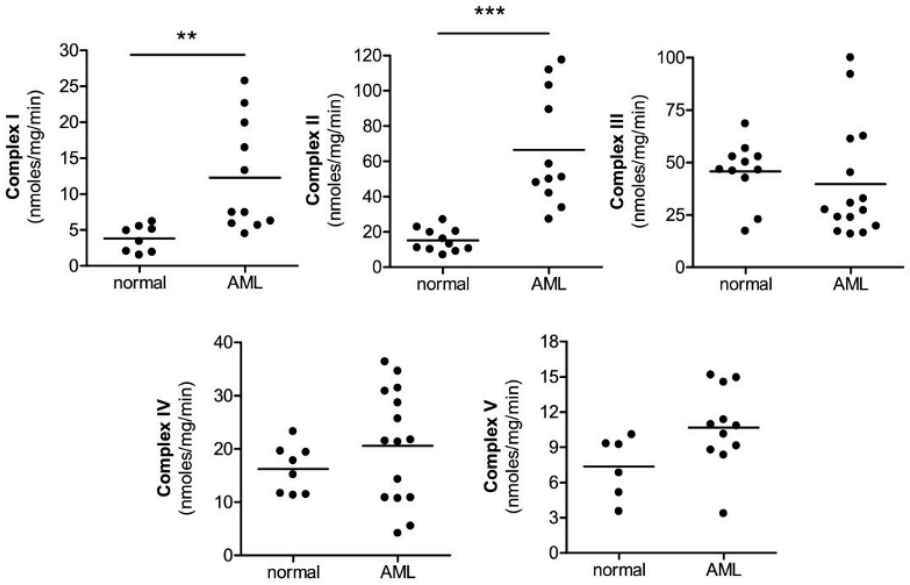

Figure 45: Comparaison de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire entre cellules saines et LAM, *d'après Sriskanthadevan et al,.*[184]

- Complexe IV

La cytochrome c oxidase catalyse cette réaction enzymatique :

$$\textbf{cytochrome } c \textbf{ réduit} + 1/2\ O_2 + 2H^+ \rightarrow \textbf{cytochrome } c \textbf{ oxydé} + H_2O$$

Ce dosage repose sur la mesure de l'oxydation du CytC Le CytC réduit absorbe la lumière à 550nm, c'est pourquoi, la diminution de l'absorbance à 550nm est proportionnelle à l'activité du complexe IV. Il n'y a pas besoin d'inhibiteurs de ce complexe comme le cyanure de potassium, car cette réaction est relativement spécifique.

- ATP synthase (= complexe V)

L'activité de l'ATP synthase est mesurée selon une méthode adaptée de *Rustin et al.* (1994). La F_0-F_1 ATP synthase catalyse la synthèse de l'ATP à partir de l'ADP et de Pi, mais il faut savoir que cette réaction est réversible. Le principe du dosage de l'ATP synthase consiste à mesurer la formation d'ADP à partir d'ATP, en utilisant le système enzymatique. Il faut pour cela mesurer l'hydrolyse de l'ATP en ADP et Pi par la F_1-ATPase, en sachant que la formation d'ADP est couplée à la formation de NAD^+ en présence de phosphoénol pyruvate (PEP), de NADH, de la pyruvate kinase (PK) et de la LDH (Figure 46).

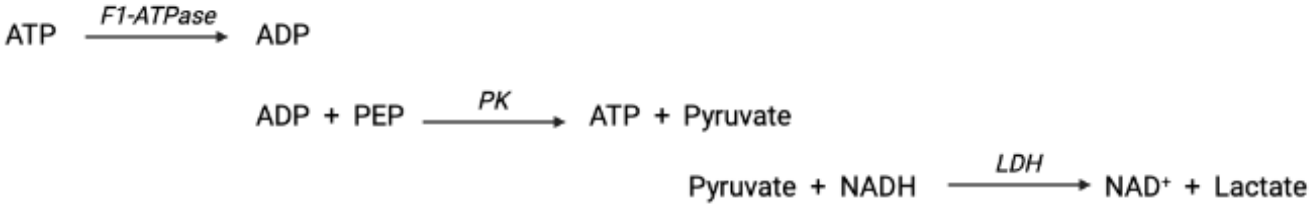

Figure 46: Cascade de réaction chimique découlant de l'ATP

L'absorbance du NADH sera alors mesurée à 340nm. La diminution de l'absorbance est proportionnelle à l'activité de l'ATPase. Ce dosage est réalisé en présence ou non d'Oligomycine, inhibiteur de l'ATP synthase, afin de mesurer l'activité spécifique de celle-ci. Cependant, il y a une certaine limite à l'analyse des activités de chaque complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, les données issues de ces dosages varient en fonction de la masse mitochondriale, c'est à dire de la quantité de mitochondries dans la cellule. Il est donc nécessaire de normaliser.

- Citrate synthase

Pour la normalisation des mitochondries, on va doser une enzyme : la citrate synthase. On dose cette enzyme du cycle de Krebs ce qui permet d'avoir un contrôle pour évaluer la quantité de mitochondrie. La citrate synthase catalyse cette réaction enzymatique :

Oxaloacétate + Acétyl CoA → Citrate + CoASH

Le CoASH formé lors de la réaction va réagir avec le 5,5' DiThiobis-2-NitroBenzoic acid (DTNB) pour se transformer en TNB, qui absorbe spécifiquement à 412nm (Figure 47).

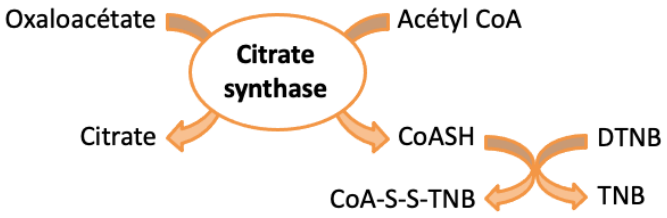

Figure 47: Mécanisme d'action de la citrate synthase

Par la suite, un ratio est réalisé entre l'activité des complexes et celle de la citrate synthase afin de normaliser les dosages des activités de chaque complexe.

C'est, dans ce contexte que, *Sriskanthadevan et al.,* ont réalisé la normalisation de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire (Figure 48)[184].

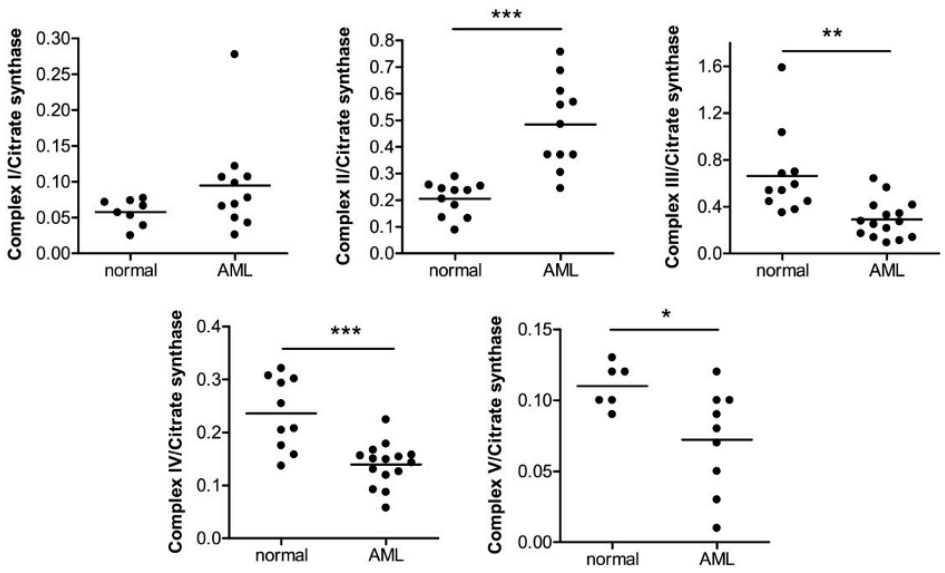

Figure 48: Comparaison de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire entre cellules saines et LAM à la suite d'une normalisation par la citrate synthase, *d'après Sriskanthadevan et al,.*[184]

i) Métabolomique & Fluxomique

Le métabolisme mitochondrial peut également être évalué par des études de métabolomique et de fluxomique. La métabolomique est l'analyse de l'ensemble des constituants de faible masse moléculaire d'une cellule ou d'un organisme. La technique de la métabolomique consiste à identifier et quantifier les métabolites d'une cellule par spectrométrie de masse (SM)[194] ou par résonance magnétique nucléaire (RMN).

La fluxomique, quant à elle, mesure la dynamique du métabolisme permettant d'obtenir le comportement du métabolisme à l'échelle d'une cellule, d'un tissu ou d'un organisme.

Ainsi, ces techniques peuvent être réalisées afin d'évaluer les cellules leucémiques ou directement le plasma des patients.

1) *À partir de cellules leucémiques*

Deux niveaux d'analyses se distinguent, soit une analyse ciblée soit une analyse globale. L'analyse ciblée a pour but de mesurer quantitativement et spécifiquement un ou un nombre réduit de métabolite. L'analyse globale, quant à elle, permet d'évaluer tous les composés appartenant à une voie métabolique ou à une famille chimique donnée. Ce type d'approche permet d'obtenir une meilleure compréhension de la fonction ou de la régulation d'une voie métaboliques et/ou de ses liens avec les autres voies métaboliques (profilage métabolique). À

travers ces méthodes, on peut soit obtenir la quantité de métabolites totaux et soit visualiser la provenance et le devenir des métabolites.

L'énergie totale produite par les cellules de mammifères est due à la dégradation du glucose, des acides aminés et/ou des lipides. Dans le cadre de la métabolique avec marquage isotopique, il est donc possible d'incuber les cellules avec du glucose dont tous les atomes de carbone 12 (C^{12}) ont été remplacés par des isotopes de carbone 13 (C^{13}). À l'aide de la spectrométrie de masse, on peut alors identifier les molécules contenant du C^{12} ou celles contenant du C^{13}. De cette manière, si l'on incube les cellules avec du glucose marqué au C^{13}, on peut suivre le devenir de ces atomes au niveau des métabolites du cycle de Krebs et donc identifier tous les métabolites issus de ce glucose. Dans ce contexte, le marquage isotopique peut se faire sur le glucose mais également sur la glutamine (un acide aminé) et le palmitate (un acide gras).

Erdem et al. (2022) ont récemment utilisé la SM afin de suivre et de quantifier le lactate marqué C^{13} sur des lignées cellulaires leucémiques, tel que les MOLM13. Ces analyses du flux métabolique du lactate marqué révèlent que les cellules LAM utilisent le lactate (converti en pyruvate) comme métabolite principal pour la respiration mitochondriale. C'est pourquoi, l''inhibition du transport du lactate en bloquant le transporteur d'acide monocarboxylique 1 (MCT1) améliore la sensibilité à l'inhibition du complexe II de la chaîne respiratoire in vitro ainsi qu'in vivo[132].

D'ailleurs la SM peut détecter des composés à des concentrations inférieures au nanomolaire [195]. Cette sensibilité supérieure est un avantage étant donné qu'elle peut détecter un nombre relativement important de composés[196]. Cependant, celle-ci présente aussi certaines limites. Il est nécessaire avec la SM, d'ioniser les composés afin de pouvoir les détecter. Ainsi, il faut savoir que cette étape d'ionisation peut être difficile à contrôler (celle-ci pouvant engendrer des problèmes de reproductibilité) mais également que certains composés non ionisables ne pourront pas être détectés par cette technique.
Dans le cadre des flux métaboliques, la méthode est fondée sur la combinaison d'expériences de marquage isotopique et d'outils mathématiques permettant de calculer les vitesses des réactions à partir du marquage isotopique des métabolites.

2) *À partir du plasma des patients atteints de LAM*

La SM permet également de doser des métabolites du métabolisme énergétique dans le sérum de patient. Le plasma des patients peut être ainsi dosé, donnant la composition des éléments relargués ou utilisés par les blastes leucémiques (par exemple le pyruvate, le lactate ou le citrate).

Grønningsæter et al. (2019) ont évalué le profils métabolomiques sériques dans des échantillons de sérum de patients atteints de LAM recevant un traitement à base d'ATRA (acide rétinoïque «all-trans») et d'acide valproïque associé à des médicaments cytotoxiques à faible dose (cytarabine, hydroxyurée, 6-mercaptopurine). Le profilage non ciblé a identifié 888 métabolites, dont environ 36 métabolites ont montré une différence significative entre les échantillons de prétraitement provenant de répondeurs et de non-répondeurs. Les métabolites concernés sont classés en peptides (gamma-glutamyltyrosine), en acides aminés (tyrosine, méthionine, histidine, lysine, thréonine, homoarginine) en métabolites d'acides aminés (indolepropionate, 2-méthylbutyrylcarnitine, 5-hydroxylysinepropionyl) en métabolites lipidiques et en métabolites de la sous-classe du métabolisme glucidique/énergétique (mannose, citrate)[184,197].

j) Mesure de la capacité de rétention calcique (CRC)

Comme expliqué précédemment, le calcium a un rôle dans le métabolisme énergétique mitochondrial avec la régulation du cycle de Krebs. Ainsi, on retient par la capacité de rétention calcique, la quantité de calcium nécessaire et suffisante pour provoquer l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP). Afin de l'évaluer, on mesure la fluorescence du Calcium Green, qui est une sonde fluorescente spécifique du calcium extra-mitochondrial qui ne se diffuse pas au travers des membranes. Comme précisé précédemment, le calcium est un puissant inducteur de l'ouverture du PTP. Cette molécule est alors ajoutée à doses fixes répétées sur une suspension de mitochondries isolées. À chaque addition, une augmentation de fluorescence est observée avant de diminuer au fur et à mesure que le calcium est capté par les mitochondries. Une fois l'ouverture du PTP provoquée, le calcium est libéré par les mitochondries entraînant une augmentation de fluorescence. La quantité de calcium utilisée pour déclencher cette ouverture détermine la capacité de rétention calcique. Bien qu'utilisée en routine pour évaluer la fonction mitochondriale, l'ensemble de cette technique s'effectue sur mitochondries isolées, ce qui ne permet pas de prendre en compte l'ensemble des contraintes métaboliques environnantes.

k) Autres techniques en lien avec le métabolisme énergétique mitochondrial

Des techniques comme la mesure de l'ouverture du pore de perméabilité et le priming mitochondrial, n'évaluent pas le métabolisme énergétique, mais néanmoins présentent des liens importants avec celui-ci. En effet, on sait que le potentiel de membrane influence l'ouverture du PTP ou bien que la protéine Bcl2 influence l'OxPhos. Ces techniques sont donc intéressantes et pertinentes vu les liens qu'elles présentent avec le métabolisme énergétique.

1) *Mesure de l'ouverture du pore de perméabilité (PTP)*

Impliquée dans de nombreuses fonctions, la mitochondrie joue un rôle majeur dans la régulation de la mort cellulaire en participant à l'apoptose par la fuite du CytC dans le cytoplasme mais aussi par l'ouverture du PTP. En effet, le PTP est reconnu comme un mécanisme essentiel à la cellule pour s'adapter à son environnement ou stress métabolique et lui permettre de décider si elle doit mourir ou survivre. Ainsi, dans certaines situations, la membrane interne devient librement perméable à tous les composés d'une taille inférieure à 1,5 kDA. Cette modification de perméabilité (= transition de perméabilité) est due à l'ouverture d'un canal non spécifique appelé le PTP. C'est par ce phénomène, qu'en réponse à des signaux de stress, la mitochondrie va libérer le CytC.

La technique de référence afin de visualiser par imagerie l'ouverture du PTP se base sur l'utilisation de Calcéine et de Cobalt[198]. La calcéine est une sonde fluorescente perméante qui se diffuse dans toute la cellule où elle émet de la fluorescence tant que la membrane plasmique reste intègre. Le cobalt, quant-à-lui, n'entre pas dans les mitochondries et éteins la fluorescence de la calcéine dans le cytosol, ce qui permet de révéler les mitochondries. Un ionophore au calcium va provoquer l'ouverture du PTP, le cobalt va alors pouvoir se diffuser partout entraînant une distribution de la calcéine (Figure 49). L'expérience est réalisée avec du CsA (prévenant le phénomène de décompartimentation et retardant l'ouverture du PTP) pour confirmer que l'effet est lié à l'ouverture du PTP.

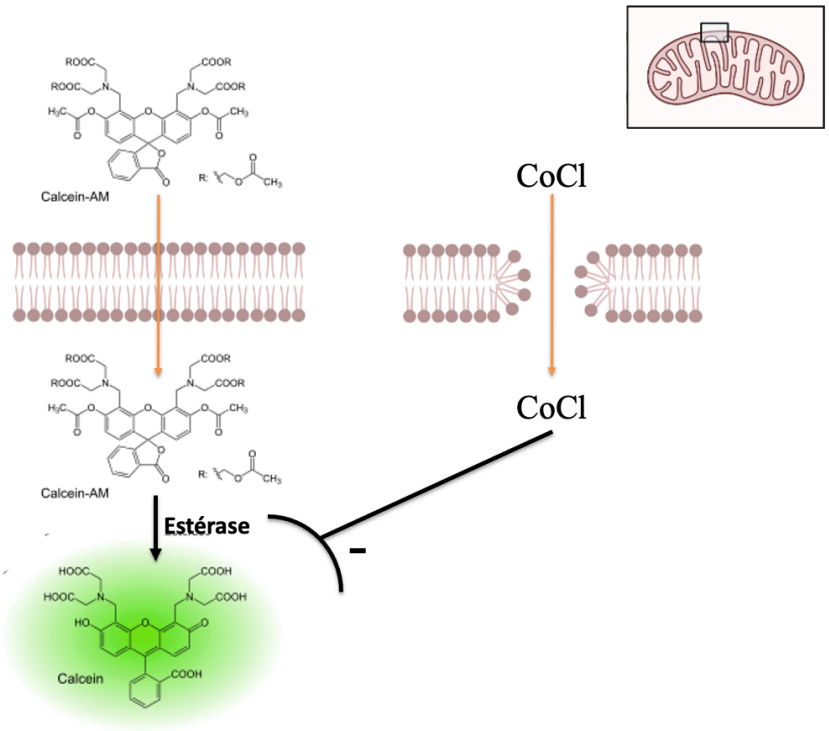

Figure 49: Évaluation du PTP par la méthode Calcéine-Cobalt

Cependant, cette technique de référence pour la visualisation de l'ouverture du PTP, présente des limites. En effet, elle permet uniquement d'interpréter deux statuts du PTP : « ouvert » ou « fermé », mais ne permet pas de visualiser le phénomène d'ouverture transitoire du PTP ou flickering, durant lequel il y a libération de certains solutés sans diminution du potentiel membranaire mitochondrial, puisque ce dernier n'est pas mesuré[85].

2) *Sensibilité au priming mitochondrial = apoptose*

La sensibilité au priming mitochondrial, c'est-à-dire à induire l'apoptose, un processus par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal. C'est un phénomène physiologique de mort cellulaire programmée. Afin d'expliquer au mieux ce phénomène, il est nécessaire de le contextualiser. Nous savons que la capacité des agents anticancéreux à induire l'apoptose des cellules leucémiques dépend en partie de leur capacité à activer la voie mitochondriale de l'apoptose. Par exemple, les agents qui attaquent l'ADN induisent l'augmentation d'expression des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 comme Bax ou Bak qui vont perméabiliser la MME et induire la libération du Cyt C, qui appartient à la chaîne respiratoire mitochondriale en assurant le transfert des électrons entre le complexe III et le complexe IV. Une fois que le CytC est libéré dans le cytosol, il se lie au facteur activateur des protéases apoptotiques (APAF1), ce qui déclenche une cascade de réactions responsables du

phénomène d'apoptose. Cependant, les cellules cancéreuses surexpriment les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 comme Bcl-2, Bcl-XL qui inhibent les protéines Bax ou Bak. Il existe cependant une troisième catégorie de protéines appelées BH3-only (Bim, tBid, Puma) qui sont capables d'inhiber Bcl-2 ou Bcl-XL en les empêchant d'inhiber Bax ou Bak[199]. Ainsi, en fonction de l'expression de toutes ces protéines, les cellules cancéreuses sont plus ou moins sensibles à l'apoptose induite par les agents anticancéreux.

Pour réaliser cette méthode, il faut perméabiliser les cellules cancéreuses avec de la digitonine et les incuber avec des peptides de la famille BH3-only. On évalue par la suite la sensibilité au priming mitochondrial soit par l'immunomarquage du CytC soit en mesurant le potentiel de membrane. Le potentiel de membrane est mesuré par la CMF où le pourcentage de cellules à mitochondries dépolarisées après exposition aux peptides BH3-only, permet de déterminer la sensibilité à l'apoptose mitochondriale.

Le tableau ci-dessous établit une synthèse des différentes techniques citées afin d'établir celles qui pourraient être utilisées en tant que biomarqueurs. Pour cela, les méthodes sont analysées en termes de faisabilité clinique, de coût financier, et des modèles d'étude en cours (Tableau 5).

Tableau 5 : Les différentes techniques évaluant le métabolisme énergétique

	Analyse fonctionnelle du métabolisme mitochondriale	**Faisabilité clinique**	**Coût** (« + » : cher / « - » : abordable)	**Protocole disponible pour le modèle de LAM de blastes de patients** (Données littérature)
Microscopie électronique		-	-	
Microscopie fluorescent confocale		-	-	
Dosage de l'ATP	√	-	-	
SCENITH	√	+	-	Sur **Fibroblastes** embryonnaires, Argüello et al., Cell Metab (2021)
Dosage de l'activité enzymatique de la chaîne respiratoire	√	-	-	Dans la **LAM**, Sriskanthadevan et al., Blood (2015)
CMF – Mesure du potentiel de membrane	√	+++	-	Dans la **LAM**, Farge et al., Cancer discovery (2017)
CMF – Mesure de la masse mitochondriale	√	+++	-	
CMF – Mesure de l'espèce réactive à l'Oxygène	√	+++	-	
Oxymétrie	√	+	-	Dans la **LAM**, Fovez et al., Cancers (2021)
Mesure de la rétention de calcium		-	-	
Métabolomique		-	+	Dans la **LAM**, Wojcicki et al., Mol Gen Metabol (2020)
Séquençage d'ADN		++	+	Dans la **LAM**, Sriskanthadevan et al., Blood (2015)
Transcriptomique		++	+	Dans la **LAM**, Bosc et al., Nature Cancer (2021) / Cartel et al., Leukemia (2021)

V. Le métabolisme mitochondrial : Biomarqueur potentiel ?

a) Qu'est-ce qu'un biomarqueur ?

Grâce au développement des connaissances sur la leucémogenèse, différents biomarqueurs pronostiques, prédictifs et théranostiques (= utilisation d'un test diagnostique, identifiant un marqueur, pour orienter la thérapeutique du patient en fonction de son statut pour le marqueur) ont pu être mis en évidence dans les LAM. En effet, différents biomarqueurs (phénotypiques, cytogénétiques et moléculaires) ont permis la mise en place des classifications actuelles de la LAM (FAB, OMS, ELN).

D'une manière générale, les biomarqueurs sont des outils de mesure des caractéristiques, de manière objective avec précision et reproductibilité. Au sens large, un biomarqueur est un marqueur mesurable qui permet de distinguer un état physiologique normal, d'un état pathologique. Au cours du temps, des biomarqueurs ont été découverts pour un grand nombre de cancers afin de trouver de meilleure façon d'aider les médecins à diagnostiquer la LAM, à en établir un pronostic (= probabilité que le cancer puisse être traité avec succès ou qu'il réapparaisse après le traitement) et à trouver quels traitements seront les plus bénéfiques.

Donc il existe de nombreux biomarqueurs qui apportent des informations différentes (Figure 50). En effet, certains fournissent une indication sur le risque de développer ultérieurement un type particulier de cancer, d'autres peuvent signaler la présence d'un cancer ou encore peuvent apporter des informations sur la nature et la gravité d'une tumeur ou permettent de suivre l'évolution du traitement.

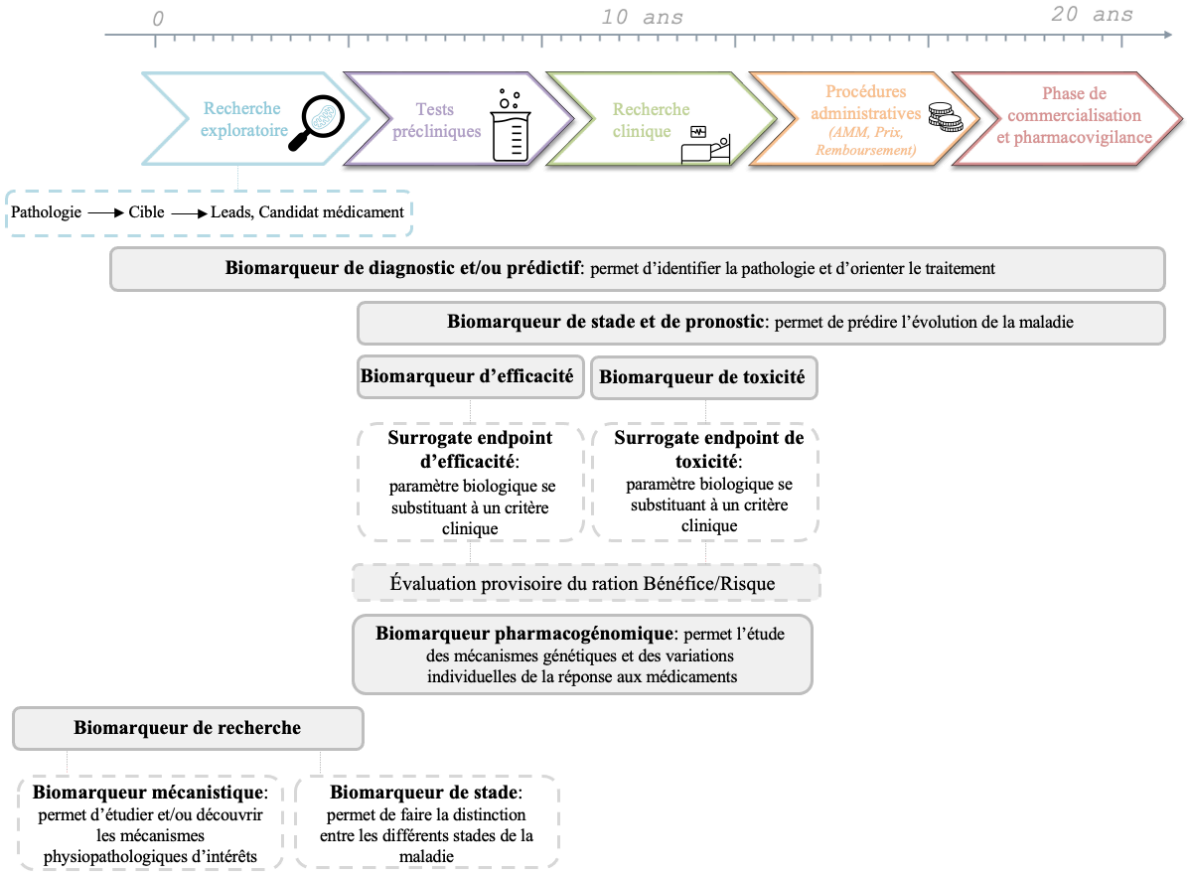

Figure 50: Classification des biomarqueurs selon leurs positionnements cliniques

b) Biomarqueurs prédictifs de la réponse aux traitements et pronostiques

Selon la définition de l'HAS, un marqueur prédictif peut être défini comme un marqueur influençant l'effet d'un traitement et dont la capacité à modifier le résultat clinique du patient a été démontrée. En d'autres termes, les biomarqueurs tumoraux prédictifs sont utilisés pour prédire la réponse ou non à une thérapie donnée[200].

Ils peuvent notamment être étudiés pour identifier les patients pouvant tirer un bénéfice des nouveaux traitements dits de précision. C'est pourquoi, la recherche de biomarqueurs est l'un des piliers de la médecine de précision qui, contrairement aux traitements déjà en place comme la chimiothérapie conventionnelle, ne repose pas seulement sur l'endroit où est située la tumeur mais est également guidée par les caractéristiques moléculaires de la tumeur.

Un pronostic concerne la progression naturelle de la maladie. Ainsi, un biomarqueur pronostique informe sur l'évolution probable d'un cancer, c'est-à-dire la récidive du cancer, la progression de la maladie ou décès indépendamment du traitement reçu.

Jusqu'à présent, l'essentiel des études portant sur les marqueurs prédictifs de réponse aux traitements ou de la survie des patients a été orientée sur l'identification d'anomalies génétiques, ce qui a permis l'émergence de nouvelles stratégies thérapeutiques personnalisées.

Ainsi les 2 biomarqueurs actuels, utilisés en clinique sont :

- Le caryotype du patient, permettant d'avoir une vue d'ensemble des anomalies génétiques propres aux patients (mutation, délétion, inversion) par exemple la translocation (8,21).
- La biologie moléculaire permet via le séquençage de nouvelle génération (NGS) d'identifier les altérations moléculaires. Elle permet d'identifier les gènes impliqués dans l'activation de la signalisation (IDH1, IDH2, FLT3), dans les suppresseurs de tumeur (TP53), dans les facteurs de transcription (NPM1) et dans la méthylation de l'ADN (DNMT3A).

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. En effet, en les intégrant à la stratification de l'ELN, ils ont permis le développement d'une médecine personnalisée où les variations individuelles sont prises en compte pour établir la stratégie thérapeutique.

c) Perspective du métabolisme mitochondrial

Les évaluations des caractéristiques histologiques et moléculaires (mutations) des LAM constituent la base du diagnostic et du suivi des hémopathies malignes. Mais les marqueurs moléculaires des LAM (génotype) ne sont pas complétement prédictifs de la réponse aux traitements. En effet, les modifications phénotypiques consécutives à l'apparition d'une mutation dépendent de nombreux facteurs tels que le contexte intracellulaire ou le microenvironnement. C'est pourquoi, certaines mutations sont inoffensives, tandis que d'autres peuvent provoquer des maladies. À l'heure actuelle, les biomarqueurs étudiés dans la LAM sont issus de l'analyse de l'ADN, où sont cherchées mutations, anomalies chromosomiques et altérations épigénétiques, ainsi qu'au niveau de l'ARN où l'expression des gènes est comparée entre les patients. Toutefois, le lien entre une anomalie au niveau du génome ou transcriptome et le phénotype cellulaire n'est pas direct. Pour qu'il y ait une conséquence fonctionnelle à la suite d'une altération génétique, il faut que cette altération induise des modifications au niveau cellulaire. Et qu'au niveau de l'ensemble des cellules leucémiques cette altération ait un impact prédominant supplantant la diversité clonale. C'est pourquoi, l'étude du phénotype et donc des

caractéristiques fonctionnelles représentent ainsi une source potentielle de nouveaux biomarqueurs. Donc il y a bien une nécessité de développer en plus de ces marqueurs génétiques, des marqueurs fonctionnels plus proches du phénotype de la cellule pour améliorer la prise en charge thérapeutique des patients et offrir de nouveaux éléments d'orientation thérapeutique aux cliniciens. Parmi les caractéristiques fonctionnelles étudiées dans la LAM, le métabolisme mitochondrial énergétique, comme nous avons pu le voir, occupe une place très importante au sein de la littérature[12,15,17,173]. Comme expliqué précédemment, le métabolisme mitochondrial est important dans la réponse aux traitements, ce qui fait de lui, une entité cible pour fournir des moyens alternatifs pour le traitement de la LAM. En effet, dans une étude dirigée par le CRCT de Toulouse, notre équipe a participé à montrer que plus les blastes présentent une forte capacité de réserve mitochondriale (Cf page 89), plus ils sont sensibles à la mort induite par le Vénétoclax avec la Cytarabine (Figure 51)[13].

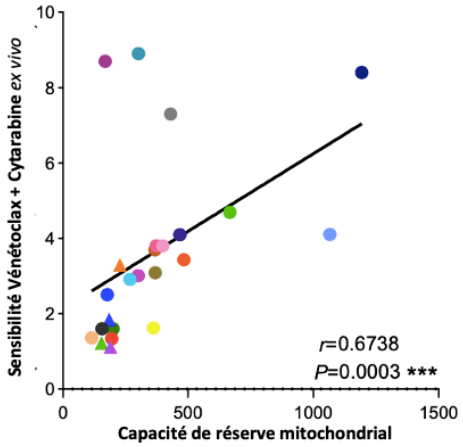

Figure 51: Relation entre la capacité de réserve mitochondriale des blastes de patients et la réponse aux traitements anticancéreux Vénétoclax + Cytarabine, *d'après Bosc et al,.*[13]

Conclusion & Perspectives

La LAM est une hémopathie dont le pronostic reste très défavorable malgré les progrès dans la compréhension de sa physiopathologie. C'est pourquoi le traitement reste un défi clinique majeur en raison d'un mauvais pronostic et d'un taux de rechute élevé. A l'heure actuelle, en clinique, l'essentiel des biomarqueurs est d'ordre génétique. Mais comme évoqué dans ce manuscrit, une anomalie génétique ne se traduit pas systématiquement par une modification du phénotype. L'émergence de biomarqueurs fonctionnels pourrait ainsi venir renforcer l'arsenal diagnostique dont dispose le clinicien lui permettant ainsi d'améliorer la prise en charge du patient grâce à une médecine personnalisée encore plus avancée. C'est là que l'évaluation du métabolisme mitochondrial montre son intérêt. L'objectif de ce travail bibliographique était de savoir si le métabolisme énergétique mitochondrial peut être un biomarqueur de la réponse au traitement dans les LAM.

Tout d'abord, à l'aide de nombreux articles, nous avons pu montrer qu'il y avait suffisamment d'arguments de recherche préclinique et clinique démontrant l'influence du métabolisme énergétique mitochondrial sur la réponse aux traitements des LAM. Dans un second temps, nous avons montré qu'il existe de nombreuses techniques capables d'appréhender et de mesurer le métabolisme énergétique sous différents aspects.

Dans le futur, il conviendra de savoir quelle est la meilleure technique qui permettra d'établir un biomarqueur associé au métabolisme mitochondrial pouvant être prédictif de la réponse aux traitements. Cette question n'est pas encore résolue. Pour y répondre, il serait nécessaire d'étudier une cohorte de patients afin d'évaluer les différentes techniques et de les comparer entre elles sur les mêmes échantillons de blastes. Cependant, un unique paramètre métabolique pourrait s'avérer insuffisant pour prédire la réponse aux traitements. Ainsi, ne serait-il pas pertinent d'associer plusieurs caractéristiques du métabolisme issues des différentes techniques afin d'obtenir un biomarqueur plus fiable. Une fois déterminé, un score mitochondrial pourrait être établit par bioinformatique, qui permettra de prédire la sensibilité ou la non-sensibilité des blastes d'un patient aux traitements (chimiothérapie, thérapies ciblées). C'est dans ce contexte que se déroule ma thèse de recherche. L'objectif est de savoir si l'évaluation du métabolisme oxydatif des blastes pourrait être un biomarqueur prédictif permettre d'orienter le clinicien vers des meilleurs choix thérapeutiques. La finalité de cette étude est le potentiel développement de nouvelles molécules au niveau de l'industrie pharmaceutique par la mise en évidence de pistes thérapeutiques évaluant le métabolisme. À court termes, les perspectives seraient l'AMM de molécules actuellement en essai clinique ciblant le métabolisme énergétique (IACS,

Tigécycline, CB839) afin de potentialiser l'effet des chimiothérapies ou de certaines thérapies ciblées. À moyen termes, les perspectives seraient d'aboutir à un nouveau biomarqueur s'intégrant dans la démarche de stratification des patients.

Références

1. Jackson SE, Chester JD. Personalised cancer medicine. Int J Cancer 2015;137(2):262-6.
2. Health C for D and R. Precision Medicine [Internet]. FDA2022 [cité 2022 sept 19];Available from: https://www.fda.gov/medical-devices/in-vitro-diagnostics/precision-medicine
3. De traditionnelle à personnalisée [Internet]. [cité 2022 sept 19];Available from: https://www.rochecanada.com/fr/media/in-focus/from-traditional-to-personal.html
4. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. Science 1956;124(3215):269-70.
5. Marchetti P, Castedo M, Susin SA, Zamzami N, Hirsch T, Macho A, et al. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. J Exp Med 1996;184(3):1155-60.
6. Huang C, Radi RH, Arbiser JL. Mitochondrial Metabolism in Melanoma. Cells 2021;10(11):3197.
7. Mamouni K, Kallifatidis G, Lokeshwar BL. Targeting Mitochondrial Metabolism in Prostate Cancer with Triterpenoids. Int J Mol Sci 2021;22(5):2466.
8. Schumacker PT, Gillespie MN, Nakahira K, Choi AMK, Crouser ED, Piantadosi CA, et al. Mitochondria in lung biology and pathology: more than just a powerhouse. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2014;306(11):L962-974.
9. Liu G, Summer R. Cellular Metabolism in Lung Health and Disease. Annu Rev Physiol 2019;81:403-28.
10. Islam RA, Hossain S, Chowdhury EH. Potential Therapeutic Targets in Energy Metabolism Pathways of Breast Cancer. Curr Cancer Drug Targets 2017;17(8):707-21.
11. Li C, Li X, Li G, Sun L, Zhang W, Jiang J, et al. Identification of a prognosis-associated signature associated with energy metabolism in triple-negative breast cancer. Oncol Rep 2020;44(3):819-37.
12. 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.
13. Bosc C, Saland E, Bousard A, Gadaud N, Sabatier M, Cognet G, et al. Mitochondrial inhibitors circumvent adaptive resistance to venetoclax and cytarabine combination therapy in acute myeloid leukemia. Nat Cancer 2021;2(11):1204-23.
14. Carter JL, Hege K, Kalpage HA, Edwards H, Hüttemann M, Taub JW, et al. Targeting mitochondrial respiration for the treatment of acute myeloid leukemia. Biochem Pharmacol 2020;182:114253.
15. 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.
16. 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):e20200924.
17. Stuani L, Sabatier M, Sarry JE. Exploiting metabolic vulnerabilities for personalized therapy in acute myeloid leukemia. BMC Biol 2019;17(1):57.
18. Jagannathan-Bogdan M, Zon LI. Hematopoiesis. Dev Camb Engl 2013;140(12):2463-7.
19. Ratajczak MZ, Kucia M. Hematopoiesis and innate immunity: an inseparable couple for good and bad times, bound together by an hormetic relationship. Leukemia 2022;36(1):23-32.
20. Rieger MA, Schroeder T. Hematopoiesis. Cold Spring Harb Perspect Biol 2012;4(12):a008250.
21. Izaguirre-Avila R, de Micheli A. [Evolution of the knowledge on the blood and its movement. Part two. The knowledge about its composition. Iatrochemistry of the blood]. Rev Investig Clin Organo Hosp Enfermedades Nutr 2005;57(1):85-97.
22. 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. Biopreservation Biobanking 2016;14(5):410-5.
23. Dzierzak E, Bigas A. Blood Development: Hematopoietic Stem Cell Dependence and

Independence. Cell Stem Cell 2018;22(5):639-51.
24. Carroll D, St Clair DK. Hematopoietic Stem Cells: Normal Versus Malignant. Antioxid Redox Signal 2018;29(16):1612-32.
25. Sobhani A, Khanlarkhani N, Baazm M, Mohammadzadeh F, Najafi A, Mehdinejadiani S, et al. Multipotent Stem Cell and Current Application. Acta Med Iran 2017;55(1):6-23.
26. Kato H, Igarashi K. [Hematopoietic cell differentiation orchestrated by transcription factor network and its related pathogenesis]. Rinsho Ketsueki 2018;59(10):1872-9.
27. Newman SA. Cell differentiation: What have we learned in 50 years? J Theor Biol 2020;485:110031.
28. Shen S, Sun Y, Matsumoto M, Shim WJ, Sinniah E, Wilson SB, et al. Integrating single-cell genomics pipelines to discover mechanisms of stem cell differentiation. Trends Mol Med 2021;27(12):1135-58.
29. Dussiau C, Fontenay M. Mechanisms underlying the heterogeneity of myelodysplastic syndromes. Exp Hematol 2018;58:17-26.
30. Metcalf D, Moore MAS. Embryonic aspects of haemopoiesis, In Haematopoietic cells,. North Holl. Publ. Co1971;173-271.
31. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. J Immunol Baltim Md 1950 1984;133(1):157-65.
32. Pang WW, Pluvinage JV, Price EA, Sridhar K, Arber DA, Greenberg PL, et al. Hematopoietic stem cell and progenitor cell mechanisms in myelodysplastic syndromes. Proc Natl Acad Sci U S A 2013;110(8):3011-6.
33. Goardon N, Marchi E, Atzberger A, Quek L, Schuh A, Soneji S, et al. Coexistence of LMPP-like and GMP-like leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. Cancer Cell 2011;19(1):138-52.
34. Majeti R, Park CY, Weissman IL. Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. Cell Stem Cell 2007;1(6):635-45.
35. Bourgeais J, Hérault O. In Vitro Analysis of Energy Metabolism in Bone-Marrow Mesenchymal Stromal Cells. Methods Mol Biol Clifton NJ 2021;2308:59-70.
36. Deynoux M, Sunter N, Hérault O, Mazurier F. Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors in Leukemias. Front Oncol 2016;6:41.
37. Tan DQ, Suda T. Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Homeostasis as Regulators of Stem Cell Fate and Function. Antioxid Redox Signal 2018;29(2):149-68.
38. Edvardsson L, Dykes J, Olofsson T. Isolation and characterization of human myeloid progenitor populations--TpoR as discriminator between common myeloid and megakaryocyte/erythroid progenitors. Exp Hematol 2006;34(5):599-609.
39. Manz MG, Miyamoto T, Akashi K, Weissman IL. Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99(18):11872-7.
40. Shastri A, Will B, Steidl U, Verma A. Stem and progenitor cell alterations in myelodysplastic syndromes. Blood 2017;129(12):1586-94.
41. Wang LD, Wagers AJ. Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. Nat Rev Mol Cell Biol 2011;12(10):643-55.
42. Sebahoun G. Hématologie clinique et biologique. In: Arnette. 2005. page 9-17 p.
43. Malfuson JV. Rôle de la niche mésenchymateuse dans la régulation du phénotype SP des progéniteurs hématopoïétiques humains. :217.
44. Mastelaro de Rezende M, Ferreira AT, Paredes-Gamero EJ. Leukemia stem cell immunophenotyping tool for diagnostic, prognosis, and therapeutics. J Cell Physiol 2020;235(6):4989-98.
45. Chopra M, Bohlander SK. The cell of origin and the leukemia stem cell in acute myeloid leukemia. Genes Chromosomes Cancer 2019;58(12):850-8.
46. guyader-Peyrou. Santé publique France. 2019;
47. Acute Myeloid Leukemia - Cancer Stat Facts [Internet]. SEER [cité 2022 sept 19];Available from: https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html
48. 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.
49. Gatta G, Capocaccia R, Botta L, Mallone S, De Angelis R, Ardanaz E, et al. Burden and

centralised treatment in Europe of rare tumours: results of RARECAREnet-a population-based study. Lancet Oncol 2017;18(8):1022-39.
50. Derolf AR, Kristinsson SY, Andersson TML, Landgren O, Dickman PW, Björkholm M. Improved patient survival for acute myeloid leukemia: a population-based study of 9729 patients diagnosed in Sweden between 1973 and 2005. Blood 2009;113(16):3666-72.
51. Lichtman MA. Obesity and the risk for a hematological malignancy: leukemia, lymphoma, or myeloma. The Oncologist 2010;15(10):1083-101.
52. 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.
53. 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 Off J Am Soc Clin Oncol 2003;21(6):1074-81.
54. 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.
55. 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):E1839.
56. Löwenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. N Engl J Med 1999;341(14):1051-62.
57. 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 2013;12(3):329-41.
58. Figueroa ME, Lugthart S, Li Y, Erpelinck-Verschueren C, Deng X, Christos PJ, et al. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. Cancer Cell 2010;17(1):13-27.
59. van Galen P, Hovestadt V, Wadsworth Ii MH, Hughes TK, Griffin GK, Battaglia S, et al. Single-Cell RNA-Seq Reveals AML Hierarchies Relevant to Disease Progression and Immunity. Cell 2019;176(6):1265-1281.e24.
60. Culp-Hill R, D'Alessandro A, Pietras EM. Extinguishing the Embers: Targeting AML Metabolism. Trends Mol Med 2021;27(4):332-44.
61. Thomas D, Majeti R. Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. Blood 2017;129(12):1577-85.
62. Craver BM, El Alaoui K, Scherber RM, Fleischman AG. The Critical Role of Inflammation in the Pathogenesis and Progression of Myeloid Malignancies. Cancers 2018;10(4):E104.
63. Vosberg S, Greif PA. Clonal evolution of acute myeloid leukemia from diagnosis to relapse. Genes Chromosomes Cancer 2019;58(12):839-49.
64. Cancer Genome Atlas Research Network, Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. N Engl J Med 2013;368(22):2059-74.
65. Lindström MS. NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling. Biochem Res Int 2011;2011:195209.
66. 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.
67. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. Nat Rev Clin Oncol 2018;15(2):81-94.
68. Danlos FX, Papo M, Micol JB. [Clonal haematopoiesis: A concise review]. Rev Med Interne 2019;40(10):684-92.
69. Vetrie D, Helgason GV, Copland M. The leukaemia stem cell: similarities, differences and clinical prospects in CML and AML. Nat Rev Cancer 2020;20(3):158-73.
70. 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.
71. Dancey JE, Bedard PL, Onetto N, Hudson TJ. The genetic basis for cancer treatment decisions. Cell 2012;148(3):409-20.

72. 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.
73. 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):a036251.
74. 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 2018;59(3):601-9.
75. Porwit A, van de Loosdrecht AA, Bettelheim P, Brodersen LE, Burbury K, Cremers E, et al. Revisiting guidelines for integration of flow cytometry results in the WHO classification of myelodysplastic syndromes-proposal from the International/European LeukemiaNet Working Group for Flow Cytometry in MDS. Leukemia 2014;28(9):1793-8.
76. Krause DS, Van Etten RA. Right on target: eradicating leukemic stem cells. Trends Mol Med 2007;13(11):470-81.
77. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. « Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update ». Blood Cancer J 2016;6(7):e441.
78. 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.
79. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. Br J Haematol 1976;33(4):451-8.
80. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. Ann Intern Med 1985;103(4):620-5.
81. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood 2016;127(20):2391-405.
82. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Blood 2017;129(4):424-47.
83. Herold T, Rothenberg-Thurley M, Grunwald VV, 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 2020;34(12):3161-72.
84. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood 2009;114(5):937-51.
85. 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 Off J Am Assoc Cancer Res 2015;21(6):1360-72.
86. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, et al. Diagnosis and Management of AML in Adults: 2022 ELN Recommendations from an International Expert Panel. Blood 2022;blood.2022016867.
87. 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.
88. Farber S, Diamond LK. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. N Engl J Med 1948;238(23):787-93.
89. 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.
90. Garg M, Nagata Y, Kanojia D, Mayakonda A, Yoshida K, Haridas Keloth S, et al. Profiling of somatic mutations in acute myeloid leukemia with FLT3-ITD at diagnosis and relapse. Blood 2015;126(22):2491-501.
91. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, Büchner T, Willman CL, Estey EH, et al. Revised

recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol 2003;21(24):4642-9.
92. Lin TL, Pagano L. The important role of intensive induction chemotherapy in the treatment of acute myeloid leukemia. Expert Rev Hematol 2021;14(3):303-14.
93. Dombret H, Gardin C. An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. Blood 2016;127(1):53-61.
94. 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.
95. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med 2015;373(12):1136-52.
96. Hajbi Y, Neagoie C, Biannic B, Chilloux A, Vedrenne E, Baldeyrou B, et al. Synthesis and biological activities of new furo[3,4-b]carbazoles: potential topoisomerase II inhibitors. Eur J Med Chem 2010;45(11):5428-37.
97. Solier S, Lansiaux A, Logette E, Wu J, Soret J, Tazi J, et al. Topoisomerase I and II inhibitors control caspase-2 pre-messenger RNA splicing in human cells. Mol Cancer Res MCR 2004;2(1):53-61.
98. Bailly C. Contemporary challenges in the design of topoisomerase II inhibitors for cancer chemotherapy. Chem Rev 2012;112(7):3611-40.
99. René B, Fossé P, Khélifa T, Jacquemin-Sablon A, Bailly C. [Cytotoxicity and interaction of amsacrine derivatives with topoisomerase II: role of the 1' substitute on the aniline nucleus]. Bull Cancer (Paris) 1997;84(10):941-8.
100. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. N Engl J Med 2012;366(12):1079-89.
101. Fernandez HF, Sun Z, Yao X, Litzow MR, Luger SM, Paietta EM, et al. Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. N Engl J Med 2009;361(13):1249-59.
102. 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 2019;9(1):16400.
103. Scheper RJ, Broxterman HJ, Scheffer GL, Kaaijk P, Dalton WS, van Heijningen TH, et al. Overexpression of a M(r) 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. Cancer Res 1993;53(7):1475-9.
104. Del Poeta G, Stasi R, Aronica G, Venditti A, Cox MC, Bruno A, et al. Clinical relevance of P-glycoprotein expression in de novo acute myeloid leukemia. Blood 1996;87(5):1997-2004.
105. Versluis J, Cornelissen JJ. Risks and benefits in a personalized application of allogeneic transplantation in patients with AML in first CR. Semin Hematol 2019;56(2):164-70.
106. Buccisano F, Walter RB. Should patients with acute myeloid leukemia and measurable residual disease be transplanted in first complete remission? Curr Opin Hematol 2017;24(2):132-8.
107. Barnes DW, Corp MJ, Loutit JF, Neal FE. Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. Br Med J 1956;2(4993):626-7.
108. Bayraktar UD, Milton DR, Guindani M, Rondon G, Chen J, Al-Atrash G, et al. Optimal Threshold and Time of Absolute Lymphocyte Count Assessment for Outcome Prediction after Bone Marrow Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant 2016;22(3):505-13.
109. Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. N Engl J Med 1957;257(11):491-6.
110. Quesnel B. Dormant tumor cells as a therapeutic target? Cancer Lett 2008;267(1):10-7.
111. Quesnel B. Tumor dormancy and immunoescape. APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand 2008;116(7-8):685-94.
112. Mediavilla C. Rechute cytologique de Leucémie Aiguë Myéloblastique en post allogreffe: une étude rétrospective monocentrique. :61.
113. Boissel N, Auclerc MF, Lhéritier V, Perel Y, Thomas X, Leblanc T, et al. Should adolescents with acute lymphoblastic leukemia be treated as old children or young adults? Comparison of the French FRALLE-93 and LALA-94 trials. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol 2003;21(5):774-80.
114. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gundem G, Van Loo P, et al. Clinical and

biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. Blood 2013;122(22):3616-27; quiz 3699.
115. Samra B, Konopleva M, Isidori A, Daver N, DiNardo C. Venetoclax-Based Combinations in Acute Myeloid Leukemia: Current Evidence and Future Directions. Front Oncol 2020;10:562558.
116. Pollyea DA, Amaya M, Strati P, Konopleva MY. Venetoclax for AML: changing the treatment paradigm. Blood Adv 2019;3(24):4326-35.
117. Chua CC, Hammond D, Kent A, Tiong IS, Konopleva MY, Pollyea DA, et al. Treatment-free remission after ceasing venetoclax-based therapy in patients with acute myeloid leukemia. Blood Adv 2022;6(13):3879-83.
118. DiNardo CD, Jonas BA, Pullarkat V, Thirman MJ, Garcia JS, Wei AH, et al. Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med 2020;383(7):617-29.
119. DiNardo CD, Pratz K, Pullarkat V, Jonas BA, Arellano M, Becker PS, et al. Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naive, elderly patients with acute myeloid leukemia. Blood 2019;133(1):7-17.
120. Pollyea DA, Stevens BM, Jones CL, Winters A, Pei S, Minhajuddin M, et al. Venetoclax with azacitidine disrupts energy metabolism and targets leukemia stem cells in patients with acute myeloid leukemia. Nat Med 2018;24(12):1859-66.
121. Roca-Portoles A, Rodriguez-Blanco G, Sumpton D, Cloix C, Mullin M, Mackay GM, et al. Venetoclax causes metabolic reprogramming independent of BCL-2 inhibition. Cell Death Dis 2020;11(8):616.
122. Lai C, Doucette K, Norsworthy K. Recent drug approvals for acute myeloid leukemia. J Hematol OncolJ Hematol Oncol 2019;12(1):100.
123. Cucchi DGJ, Polak TB, Ossenkoppele GJ, Uyl-De Groot CA, Cloos J, Zweegman S, et al. Two decades of targeted therapies in acute myeloid leukemia. Leukemia 2021;35(3):651-60.
124. Spreafico A, Hansen AR, Abdul Razak AR, Bedard PL, Siu LL. The Future of Clinical Trial Design in Oncology. Cancer Discov 2021;11(4):822-37.
125. Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Coller HA, et al. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. Cancer Cell 2010;17(3):225-34.
126. Perl AE. The role of targeted therapy in the management of patients with AML. Blood Adv 2017;1(24):2281-94.
127. Becker JS, Fathi AT. Targeting IDH Mutations in AML: Wielding the Double-edged Sword of Differentiation. Curr Cancer Drug Targets 2020;20(7):490-500.
128. Montesinos P, Recher C, Vives S, Zarzycka E, Wang J, Bertani G, et al. Ivosidenib and Azacitidine in IDH1-Mutated Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med 2022;386(16):1519-31.
129. 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.
130. Zhao JC, Agarwal S, Ahmad H, Amin K, Bewersdorf JP, Zeidan AM. A review of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia. Blood Rev 2022;52:100905.
131. 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 U S A 2016;113(43):E6669-78.
132. Erdem A, Marin S, Pereira-Martins DA, Geugien M, Cunningham A, Pruis MG, et al. Inhibition of the succinyl dehydrogenase complex in acute myeloid leukemia leads to a lactate-fuelled respiratory metabolic vulnerability. Nat Commun 2022;13(1):2013.
133. 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.
134. 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.
135. 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.
136. Liu W, Chen G. Regulation of energy metabolism in human pluripotent stem cells. Cell Mol Life Sci CMLS 2021;78(24):8097-108.

137. Song K, Li M, Xu XJ, Xuan L, Huang GN, Song XL, et al. HIF-1α and GLUT1 gene expression is associated with chemoresistance of acute myeloid leukemia. Asian Pac J Cancer Prev APJCP 2014;15(4):1823-9.
138. 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):127.
139. Huizing M, Ruitenbeek W, Thinnes FP, DePinto V, Wendel U, Trijbels FJ, et al. Deficiency of the voltage-dependent anion channel: a novel cause of mitochondriopathy. Pediatr Res 1996;39(5):760-5.
140. Khan DH, Mullokandov M, Wu Y, Voisin V, Gronda M, Hurren R, et al. Mitochondrial carrier homolog 2 is necessary for AML survival. Blood 2020;136(1):81-92.
141. Kreitz J, Schönfeld C, Seibert M, Stolp V, Alshamleh I, Oellerich T, et al. Metabolic Plasticity of Acute Myeloid Leukemia. Cells 2019;8(8):E805.
142. Nagampalli RSK, Quesñay JEN, Adamoski D, Islam Z, Birch J, Sebinelli HG, et al. Human mitochondrial pyruvate carrier 2 as an autonomous membrane transporter. Sci Rep 2018;8(1):3510.
143. Jitrapakdee S, St Maurice M, Rayment I, Cleland WW, Wallace JC, Attwood PV. Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase. Biochem J 2008;413(3):369-87.
144. 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.
145. Chen WL, Wang YY, 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 2016;30(5):779-91.
146. 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):13101.
147. Guitart AV, 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;214(3):719-35.
148. Murai M, Miyoshi H. Current topics on inhibitors of respiratory complex I. Biochim Biophys Acta 2016;1857(7):884-91.
149. 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 Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol 2018;47(1):330-43.
150. Bezawork-Geleta A, Rohlena J, Dong L, Pacak K, Neuzil J. Mitochondrial Complex II: At the Crossroads. Trends Biochem Sci 2017;42(4):312-25.
151. Kluckova K, Bezawork-Geleta A, Rohlena J, Dong L, Neuzil J. Mitochondrial complex II, a novel target for anti-cancer agents. Biochim Biophys Acta 2013;1827(5):552-64.
152. Klimova T, Chandel NS. Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF. Cell Death Differ 2008;15(4):660-6.
153. Lång E, Grudic A, Pankiv S, Bruserud O, 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.
154. Walker JE. The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. Biochem Soc Trans 2013;41(1):1-16.
155. 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.
156. Nakamura-Ishizu A, Ito K, Suda T. Hematopoietic Stem Cell Metabolism during Development and Aging. Dev Cell 2020;54(2):239-55.
157. Takubo K, Goda N, Yamada W, Iriuchishima H, Ikeda E, Kubota Y, et al. Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells. Cell Stem Cell 2010;7(3):391-402.
158. 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.

159. 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.
160. 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;96(8):863-71.
161. Mortensen M, Ferguson DJP, Simon AK. Mitochondrial clearance by autophagy in developing erythrocytes: clearly important, but just how much so? Cell Cycle Georget Tex 2010;9(10):1901-6.
162. 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 J Tech Methods Pathol 2013;93(6):690-700.
163. 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;2:206-10.
164. Pence BD, Yarbro JR. Aging impairs mitochondrial respiratory capacity in classical monocytes. Exp Gerontol 2018;108:112-7.
165. Herst PM, Howman RA, Neeson PJ, Berridge MV, 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.
166. 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.
167. Mondet J, Lo Presti C, Chevalier S, Bertrand A, Tondeur S, Blanchet S, et al. Mitochondria in human acute myeloid leukemia cell lines have ultrastructural alterations linked to deregulation of their respiratory profiles. Exp Hematol 2021;98:53-62.e3.
168. Skrtić M, Sriskanthadevan S, Jhas B, Gebbia M, Wang X, Wang Z, et al. Inhibition of mitochondrial translation as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia. Cancer Cell 2011;20(5):674-88.
169. Marchetti P, Guerreschi P, Mortier L, Kluza J. Integration of Mitochondrial Targeting for Molecular Cancer Therapeutics. Int J Cell Biol 2015;2015:283145.
170. Panina SB, Pei J, Baran N, Konopleva M, Kirienko NV. Utilizing Synergistic Potential of Mitochondria-Targeting Drugs for Leukemia Therapy. Front Oncol 2020;10:435.
171. Yang H, Tabe Y, Sekihara K, Saito K, Ma H, Ruvolo V, et al. Novel Oxidative Phosphorylation Inhibitor IACS-010759 Induces AMPK-Dependent Apoptosis of AML Cells. Blood 2017;130:1245.
172. Jacque N, Ronchetti AM, Larrue C, Meunier G, Birsen 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.
173. Molina JR, Sun Y, Protopopova M, Gera S, Bandi M, Bristow C, et al. An inhibitor of oxidative phosphorylation exploits cancer vulnerability. Nat Med 2018;24(7):1036-46.
174. Bregante J, Schönbichler A, Pölöske D, Degenfeld-Schonburg L, Monzó Contreras G, Hadzijusufovic E, et al. Efficacy and Synergy of Small Molecule Inhibitors Targeting FLT3-ITD+ Acute Myeloid Leukemia. Cancers 2021;13(24):6181.
175. Buttgereit F, Brand MD. A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. Biochem J 1995;312 (Pt 1):163-7.
176. Lindqvist LM, Tandoc K, Topisirovic I, Furic L. Cross-talk between protein synthesis, energy metabolism and autophagy in cancer. Curr Opin Genet Dev 2018;48:104-11.
177. Argüello RJ, Combes AJ, Char R, Gigan JP, Baaziz AI, Bousiquot E, et al. SCENITH: A Flow Cytometry-Based Method to Functionally Profile Energy Metabolism with Single-Cell Resolution. Cell Metab 2020;32(6):1063-1075.e7.
178. Hüttemann M, Lee I, Pecinova A, Pecina P, Przyklenk K, Doan JW. Regulation of oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease. J Bioenerg Biomembr 2008;40(5):445-56.
179. Chen LB. Mitochondrial membrane potential in living cells. Annu Rev Cell Biol 1988;4:155-81.
180. Kang MG, Kim YN, Lee JH, Szardenings M, Baek HJ, Kook H, et al. Clinicopathological Implications of Mitochondrial Genome Alterations in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. Ann Lab Med 2016;36(2):101-10.
181. Hlozkova K, Pecinova A, Alquezar-Artieda N, Pajuelo-Reguera D, Simcikova M, Hovorkova

L, et al. Metabolic profile of leukemia cells influences treatment efficacy of L-asparaginase. BMC Cancer 2020;20(1):526.
182. Fuller KM, Arriaga EA. Advances in the analysis of single mitochondria. Curr Opin Biotechnol 2003;14(1):35-41.
183. Mannella CA. The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis 2006;1762(2):140-7.
184. Sriskanthadevan S, Jeyaraju DV, Chung TE, Prabha S, Xu W, Skrtic M, et al. AML cells have low spare reserve capacity in their respiratory chain that renders them susceptible to oxidative metabolic stress. Blood 2015;125(13):2120-30.
185. Ishikawa K, Takenaga K, Akimoto M, Koshikawa N, Yamaguchi A, Imanishi H, et al. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. Science 2008;320(5876):661-4.
186. Petros JA, Baumann AK, Ruiz-Pesini E, Amin MB, Sun CQ, Hall J, et al. mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102(3):719-24.
187. Divakaruni AS, Rogers GW, Murphy AN. Measuring Mitochondrial Function in Permeabilized Cells Using the Seahorse XF Analyzer or a Clark-Type Oxygen Electrode. Curr Protoc Toxicol 2014;60:25.2.1-16.
188. Zhang J, Nuebel E, Wisidagama DRR, Setoguchi K, Hong JS, Van Horn CM, et al. Measuring energy metabolism in cultured cells, including human pluripotent stem cells and differentiated cells. Nat Protoc 2012;7(6):10.1038/nprot.2012.048.
189. 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 Off Publ Fed Am Soc Exp Biol 2020;34(10):13106-24.
190. Fovez Q, Laine W, Goursaud L, Berthon C, Germain N, Degand C, et al. Clinically Relevant Oxygraphic Assay to Assess Mitochondrial Energy Metabolism in Acute Myeloid Leukemia Patients. Cancers 2021;13(24):6353.
191. Liyanage SU, Hurren R, Voisin V, Bridon G, Wang X, Xu C, et al. Leveraging increased cytoplasmic nucleoside kinase activity to target mtDNA and oxidative phosphorylation in AML. Blood 2017;129(19):2657-66.
192. Konovalova S. Analysis of Mitochondrial Respiratory Chain Complexes in Cultured Human Cells using Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Immunoblotting. J Vis Exp JoVE 2019;(144).
193. Jonckheere AI, Hogeveen M, Nijtmans LGJ, van den Brand M a. M, Janssen AJM, Diepstra JHS, et al. A novel mitochondrial ATP8 gene mutation in a patient with apical hypertrophic cardiomyopathy and neuropathy. J Med Genet 2008;45(3):129-33.
194. Palmer A, Phapale P, Chernyavsky I, Lavigne R, Fay D, Tarasov A, et al. FDR-controlled metabolite annotation for high-resolution imaging mass spectrometry. Nat Methods 2017;14(1):57-60.
195. Flamini R, De Rosso M, Bavaresco L. Study of Grape Polyphenols by Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry (UHPLC/QTOF) and Suspect Screening Analysis. J Anal Methods Chem 2015;2015:350259.
196. Simón-Manso Y, Lowenthal MS, Kilpatrick LE, Sampson ML, Telu KH, Rudnick PA, et al. Metabolite profiling of a NIST Standard Reference Material for human plasma (SRM 1950): GC-MS, LC-MS, NMR, and clinical laboratory analyses, libraries, and web-based resources. Anal Chem 2013;85(24):11725-31.
197. Grønningsæter IS, Fredly HK, Gjertsen BT, Hatfield KJ, Bruserud Ø. Systemic Metabolomic Profiling of Acute Myeloid Leukemia Patients before and During Disease-Stabilizing Treatment Based on All-Trans Retinoic Acid, Valproic Acid, and Low-Dose Chemotherapy. Cells 2019;8(10):E1229.
198. Petronilli V, Miotto G, Canton M, Brini M, Colonna R, Bernardi P, et al. Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. Biophys J 1999;76(2):725-34.
199. Gavathiotis E, Suzuki M, Davis ML, Pitter K, Bird GH, Katz SG, et al. BAX activation is initiated at a novel interaction site. Nature 2008;455(7216):1076-81.
200. Luporsi É, André F, Bellocq JP, Caron Y, Fumoleau P, Gompel A, et al. Rapport 2009 sur l'état des connaissances relatives aux biomarqueurs tissulaires uPA/PAI-1, Oncotype DX™ et MammaPrint® dans la prise en charge du cancer du sein. Oncologie 2010;12(2):158-63.

Université de Lille
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2021/2022

Nom : DEGAND
Prénom : Claire

Titre de la thèse : Les différentes méthodes de mesure du métabolisme énergétique mitochondrial des Leucémies Aiguës Myéloïdes pour établir un biomarqueur de la réponse aux traitements

Mots-clés : Leucémie Aiguë Myéloïde, métabolisme énergétique mitochondrial, biomarqueur, prédictivité, médecine de précision.

Résumé : Le lien entre cancer et mitochondries s'est tissé au gré de l'avancement des connaissances dans ces deux domaines. Un certain nombre de travaux démontre l'influence du métabolisme énergétique mitochondrial sur la sensibilité et la résistance aux traitements des leucémies aiguës myéloïdes. Par exemple, les cellules leucémiques présentant un statut de phosphorylation oxydative élevé (High OxPhos) se caractérisent par une résistance aux médicaments tels que la Cytarabine. Il convient donc maintenant de déterminer comment mesurer le métabolisme mitochondrial. Au travers de ce manuscrit, nous décrirons l'ensemble des techniques qui peuvent être utilisées pour mesurer le métabolisme mitochondrial aussi bien au niveau de l'expression des gènes, de la consommation d'oxygène, de l'activité enzymatique de la chaîne respiratoire, de la masse mitochondriale, du potentiel de membrane, ou encore des espèces réactives de l'oxygène. Ce travail bibliographique démontre qu'il y a suffisamment d'arguments dans la littérature qui montrent que le métabolisme mitochondrial est un potentiel biomarqueur de la réponse aux traitements des LAM. Les articles scientifiques démontrent également qu'il y a un grand nombre de techniques qui permettent de l'évaluer. Maintenant, il conviendra de déterminer quelles sont les meilleures techniques, en prenant en compte le coût et la faisabilité clinique de la mesure.

Membres du jury :

Président :	**Professeur Delphine ALLORGE**, Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie, Lille, UFR3S, Praticien Hospitalier, CHRU, Lille.
Directeur, conseiller de thèse :	**Professeur Guillaume GARÇON,** Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie, Lille, URF3S.
Assesseur(s) :	**Professeur Thierry BROUSSEAU,** Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie, Lille, UFR3S, Praticien Hospitalier, CHRU, Lille.
	Professeur Anne MUHR-TAILLEUX, Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie, Lille, UFR3S.
	Professeur Jérôme KLUZA, Professeur des Universités, Faculté de Médecine, Lille, UFR3S.