



HAL
open science

Reprogrammation métabolique dans les leucémies aigues myéloblastiques (LAM) : Impact clinique et mécanismes oncogéniques

Caroline Lo Presti

► To cite this version:

Caroline Lo Presti. Reprogrammation métabolique dans les leucémies aigues myéloblastiques (LAM) : Impact clinique et mécanismes oncogéniques. Biologie du développement. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2020. Français. NNT : 2020GRALV017 . tel-03151354

HAL Id: tel-03151354

<https://theses.hal.science/tel-03151354v1>

Submitted on 24 Feb 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biologie du développement - Oncogénèse**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Caroline LO PRESTI

Thèse dirigée par le **Pr Pascal MOSSUZ – CHU Grenoble Alpes**,

préparée au sein de **Laboratoire CRI IAB - Centre de Recherche Epigenetics, Chronic Diseases, Cancer - Institute for Advanced Biosciences**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Reprogrammation métabolique dans les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) : Impact clinique et mécanismes oncogéniques.

Metabolic reprogramming in AML: Clinical impact and oncogenic mechanisms.

Thèse soutenue publiquement le **30 octobre 2020**
devant le jury composé de :

Monsieur Pascal MOSSUZ

PU-PH, CHU Grenoble Alpes, Directeur de thèse

Monsieur Cyrille BOTTE

Directeur de recherche, Institut pour l'Avancée des Biosciences,
Président du jury

Madame Florence FAUELLE

Chercheur, Grenoble Institut des Neurosciences, Examineur

Monsieur Emmanuel GYAN

Professeur des universités - Praticien hospitalier, CHU de Tours,
Examineur

Madame Véronique DE MAS

Professeur des universités - Praticien hospitalier, IUCT Oncopole
CHU Toulouse, Rapporteur

Monsieur Jean-Emmanuel SARRY

Chercheur, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse,
Rapporteur



Remerciements

Au Professeur Pascal Mossuz,

Merci de m'avoir encadrée tout au long de ce travail de thèse, d'avoir toujours été disponible dès que j'en ai eu besoin, et de m'avoir permis de réaliser ce travail au sein de votre équipe.

A Florence Fauvelle,

Merci de m'avoir toujours bien encadrée et d'avoir été à l'écoute, ainsi que de m'avoir appris toutes les choses nécessaires à l'avancement de mes travaux de thèse durant ces années.

A Cyrille Botté et Yoshiki,

Merci d'avoir accepté de juger mon travail de thèse, et merci pour les bons moments partagés au sein de la team Apicolipid.

Aux Professeurs Véronique De Mas, Emmanuel Gyan et à Jean-Emmanuel Sarry

Merci d'avoir accepté de faire partie des membres du jury. Merci pour le temps que vous avez consacré à lire et évaluer mon travail de thèse.

Au Docteur Julie Mondet,

Merci encore pour m'avoir toujours aidée dans mes travaux et pour ces années partagées ensemble.

A mes parents et à ma sœur,

Merci d'avoir toujours été là pour moi, et de m'avoir soutenue jusqu'au bout de cette longue route qui marque la fin de mes études.

A Luigi,

Je ne te remercierai jamais assez d'être là pour moi au quotidien, de me supporter et de nous faire avancer dans nos projets. Nous serons bientôt unis pour la vie, et le meilleur reste à venir...

A Johanna,

Merci également à Johanna, avec qui j'ai partagé mon bureau pendant tout ce temps. Merci pour ton aide souvent indispensable dans mes manip.

Résumé

Reprogrammation métabolique dans les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) : Impact clinique et mécanismes oncogéniques.

Le métabolisme des cellules cancéreuses est fortement perturbé et dérégulé dans les cancers. Plusieurs exemples illustrent ce phénomène, notamment la reprogrammation métabolique décrite dans l'effet Warburg, les dérégulations fonctionnelles de certaines voies métaboliques telles que l'augmentation de la production de ROS dans les cellules cancéreuses, ou la mise en évidence d'oncométabolites liés à des mutations acquises telles que les mutations IDH1/2 qui entraînent la production d'un métabolite directement associé au processus leucémique dans les LAM. Afin de caractériser les reprogrammations métaboliques associées au processus leucémique, nous avons analysé par une approche HRMAS les métabolites produits par différentes lignées cellulaires leucémiques représentant différents sous types de LAM (génotype et phénotype différents). Dans ce modèle, nous avons montré que chaque type de lignée présentait un métabolisme particulier à l'état basal, témoin d'une signature métabolique différente selon la nature de la lignée. En situation de stress métabolique (culture en milieu sans sérum), toutes ces lignées développent des mécanismes d'adaptation de leur métabolisme à la carence en nutriments. En particulier, il existe une signature commune caractérisée par la surexpression de métabolites de la voie des phospholipides et de régulation du stress oxydant au bout de 24h de culture en milieu sans sérum. Grâce à ces mécanismes d'adaptation les cellules leucémiques retrouvent au bout de 48h, une viabilité supérieure à 95% et un profil métabolique quasi-identique aux conditions normales. Ces résultats montrent que les cellules leucémiques développent des mécanismes communs de survie, impliquant notamment des dérégulations du métabolisme des lipides, qui leur permettent de continuer à proliférer en situation de stress métabolique. D'autres conditions expérimentales ont été testées, notamment en condition de carence en glucose afin d'explorer la piste de la dérégulation de certains acides aminés comme l'alanine dans ces lignées. De plus, l'étude quantitative et qualitative des acides gras dans les LAM via une approche

lipidomique révèle une adaptation similaire des profils lipidomiques des lignées dans les mêmes conditions de privation en sérum précédemment testées. En parallèle, dans une étude sur 54 patients au diagnostic de LAM, nous avons confirmé par l'approche HRMAS qu'il existait chez les patients LAM des différences de profil métabolique en fonction du sous-type de LAM. Nous avons également montré que ces signatures métaboliques étaient significativement corrélées aux sous-groupes pronostiques cytogénétiques, à la réponse au traitement par chimiothérapie et à la survie des patients. Nous montrons notamment que les métabolites surexprimés chez les patients de mauvais pronostic sont retrouvés surexprimés également chez les patients réfractaires au traitement. L'analyse de ces métabolites montre le rôle particulier de plusieurs voies métaboliques dans le pronostic des LAM : i) la dérégulation de la synthèse de 2-hydroxyglutarate associée aux mutations de l'enzyme IDH1/2, ii) la dérégulation du métabolisme des phospholipides, retrouvant une surexpression de phospholipides dans les plasmas de patients de pronostic défavorable, et iii) la surexpression de la synthèse de certains acides aminés chez les patients chimiorésistants, suggérant une implication de la voie de signalisation LKB1/AMPK.

Mots clés : leucémie aiguë myéloïde, reprogrammation métabolique, profil métabolique

Abstract

Metabolic reprogramming in acute myeloid leukemia (AML): Clinical impact and oncogenic mechanisms.

Cells metabolism is strongly disturbed and deregulated in cancers. Several examples reflect this phenomenon, including metabolic reprogramming described in the Warburg effect, functional deregulations of particular metabolic pathways such as the increase of the ROS production in cancer cells, or the identification of oncometabolites linked to acquired mutations such as IDH1/2 mutations, which lead to the production of a metabolite directly linked to the leukemic process in AML. In order to characterize the metabolic reprogramming associated with the leukemic process, we analyzed by an HRMAS approach the metabolites produced by different leukemic cell lines representing different subtypes of AML (different genotype and phenotype). In this model, we have shown that each type of cell line exhibited a particular metabolism in the basal state, witnessing a different metabolic signature depending on the nature of the cell line. In condition of metabolic stress (culture in a serum-free environment), all these cell lines develop mechanisms to adapt their metabolism to nutrient deficiency. Particularly, there is a common signature characterized by the overexpression of metabolites of the phospholipid pathway and of regulation of oxidative stress after 24 hours of culture in a medium without serum. Thanks to these adaptation mechanisms, the leukemic cells find after 48 hours a viability higher than 95% and a metabolic profile almost identical to normal conditions. These results show that leukemic cells develop common survival mechanisms, notably involving deregulations of lipid metabolism, which allow them to continue to proliferate in condition of metabolic stress. Other experimental conditions have been tested, in particular in glucose deficiency conditions in order to explore the path of deregulation of some amino acids such as alanine in these cell lines. Moreover, the quantitative and qualitative study of fatty acids in AMLs through a lipidomic approach reveals a similar adaptation of the lipidomic profiles of the cell lines in the same serum-free conditions previously tested. In parallel, in a study on 54 patients diagnosed with AML, we confirmed by the HRMAS approach that there were

differences in metabolic profile in AML patients according to the AML subtype. We also showed that these metabolic signatures were significantly correlated with cytogenetic prognostic subgroups, response to chemotherapy treatment and patient survival. We show in particular that the metabolites overexpressed in patients with poor prognosis are found overexpressed also in patients refractory to treatment. The analysis of these metabolites shows the particular role of several metabolic pathways in the prognosis of AML: i) deregulation of the synthesis of 2-hydroxyglutarate associated with mutations in the IDH1/2 enzyme, ii) deregulation of the metabolism of phospholipids, showing an overexpression of phospholipids in adverse prognosis patients plasmas, and iii) overexpression of the synthesis of some amino acids in chemoresistant patients, suggesting an involvement of the LKB1/AMPK signaling pathway.

Keywords: acute myeloid leukemia, metabolic reprogramming, metabolic profile

Table des matières

Remerciements	2
Résumé	4
Abstract	6
Listes des figures et tableaux	11
Liste des abréviations	15
Revue générale de la littérature	18
1. Les leucémies aiguës myéloïdes	18
1.1. Généralités	18
1.2. Epidémiologie	18
1.3. Présentation clinique	18
1.4. Diagnostic biologique.....	19
1.4.1. Myélogramme	19
1.4.2. Morphologie des blastes.....	20
1.4.3. Cytochimie	20
1.4.4. Immunophénotypage	22
1.4.5. Anomalies cytogénétiques	22
1.4.6. Anomalies moléculaires	25
1.5. Facteurs pronostiques.....	27
1.6. Traitement.....	30
1.6.1. Traitement standard.....	30
1.6.2. Nouveaux agents.....	31
1.7. Physiopathologie et leucémogénèse	33
1.7.1. Facteurs prédisposants	33
1.7.2. Anomalies moléculaires.....	33
1.7.3. Caractéristiques des cellules souches leucémiques.....	39
1.7.4. Dérégulations fonctionnelles associées.....	40
2. Les dérégulations métaboliques	42
2.1. Dans les cancers.....	42
2.1.1. L'effet Warburg	42
2.1.2. Le métabolisme du glucose.....	44
2.1.3. Le cycle de Krebs	46
2.1.4. Le métabolisme de la glutamine	48
2.1.5. Le métabolisme des lipides	49
2.1.6. Le métabolisme des phospholipides.....	52
2.2. Dans les LAM	54
2.2.1. Les dérégulations des espèces réactives de l'oxygène	54
2.2.2. Les dérégulations de l'isocitrate déshydrogénase.....	56
2.2.3. Les dérégulations du métabolisme du glucose	57
2.2.4. Les dérégulations du métabolisme de la glutamine	59
2.2.5. Les dérégulations du métabolisme lipidique.....	60
2.2.6. Les dérégulations du métabolisme des phospholipides	62
2.2.7. Les dérégulations des régulateurs du métabolisme : la voie LKB1/AMPK/mTOR	64
2.2.8. Cartographie des voies métaboliques fonctionnelles caractérisées chez les patients atteints de LAM	67

3. L'étude du métabolisme par une approche métabolomique.....	69
3.1. Contexte.....	69
3.2. La métabolomique.....	69
3.3. Méthodes d'analyse.....	70
3.4. La métabolomique basée sur la RMN-HRMAS.....	71
3.5. Principe général d'un protocole de métabolomique.....	73
3.6. Traitement des données collectées.....	75
4. L'étude du métabolisme par une approche lipidomique.....	77
4.1. Contexte.....	77
4.2. La lipidomique.....	77
4.3. Méthodes d'analyse.....	78
4.4. La lipidomique basée sur la GC-MS.....	79
4.5. Principe général d'un protocole de lipidomique.....	82
Objectifs du travail de thèse.....	84
<i>Partie 1 : L'activation différentielle des voies métaboliques dans les lignées cellulaires leucémiques.....</i>	<i>86</i>
1. Contexte.....	86
2. Résumé.....	87
<i>Partie 2 : La reprogrammation métabolique des cellules leucémiques de LAM dépend du génotype des patients et influence leur pronostic.....</i>	<i>106</i>
1. Contexte.....	106
2. Résumé.....	107
<i>Partie 3 : Exploration des pistes complémentaires à l'issue des analyses par RMN-HRMAS</i>	<i>142</i>
1. Introduction et contexte.....	142
1.1. L'exploration du métabolisme des phospholipides.....	142
1.2. L'exploration du métabolisme des acides aminés : exemple de l'alanine.....	143
2. Matériels et méthodes.....	144
2.1. Analyse lipidomique.....	144
2.1.1. Extraction des lipides totaux et dérivatisation des métabolites.....	144
2.1.2. Analyse des différentes espèces lipidiques.....	145
2.2. Analyse de la voie LKB1/AMPK impliquant l'alanine.....	147
2.2.1. Culture cellulaire.....	147
2.2.2. Dosage d'alanine.....	147
2.2.3. Western blot.....	148
3. Résultats.....	149
3.1. Modifications du métabolisme lipidique et phospholipidique.....	149
3.1.1. Quantification des acides gras totaux.....	149
3.1.2. Quantification des espèces lipidiques dans les lignées KG1 et K562.....	152
3.1.3. Analyses des plasmas de patients.....	154
3.2. Modifications de l'alanine impliquant la voie LKB1/AMPK.....	158
3.2.1. Dosage d'alanine.....	158
3.2.2. Étude de l'activation de LKB1.....	159
4. Discussion.....	161

4.1. Les modifications du métabolisme lipidique et phospholipidique en lien avec la prolifération cellulaire et le pronostic	161
4.2. Les dérégulations du métabolisme de l'alanine en lien avec la voie LKB1/AMPK/mTOR	164
Discussion générale	167
1. Les voies métaboliques activées dans les lignées cellulaires de LAM dépendent de leur génotype et des conditions micro-environnementales	167
2. La reprogrammation métabolique des cellules leucémiques dépend du phénotype et du génotype des patients et joue un rôle pronostique significatif	169
2.1. Les blastes de patients présentent des différences significatives de leur métabolisme selon leur niveau de différenciation	170
2.2. Il existe un lien entre le métabolisme et le statut moléculaire des cellules leucémiques.....	171
2.3. Les différences de profils métaboliques des blastes ont un impact sur le pronostic des patients	173
2.4. Les dérégulations du métabolisme phospholipidique ont un rôle particulier sur le pronostic, la survie et la réponse au traitement	174
3. Les résultats des analyses complémentaires confirment nos hypothèses de départ.....	176
3.1. L'augmentation de la charge lipidique des cellules est corrélée à un pronostic défavorable dans les LAM	176
3.2. La compréhension du métabolisme de l'alanine ouvre la voie à l'exploration du métabolisme d'autres acides aminés dans les LAM	177
Conclusion générale	179
Bibliographie	185
Annexe	205
Résumé.....	211

Listes des figures et tableaux

Figure 1. Blastos négatifs (gauche) et positifs (droite) pour la myéloperoxydase.....	17
Figure 2. Monocytes et blastos négatifs (gauche) et positifs (droite) pour la butyrate estérase.....	17
Figure 3. Hétérogénéité moléculaire des LAM à caryotype normal. D'après Döhner <i>et al</i> , Blood, 2010.....	23
Figure 4. Caractérisation des mutations découvertes dans les LAM. D'après l'équipe de recherche du projet « The Cancer Genome Atlas », NEJM, 2013.....	31
Figure 5. Distribution de sous-types de LAM définis au niveau cytogénétique et moléculaire. D'après Grimwade <i>et al</i> , Blood, 2016.....	32
Figure 6. Facteurs suspectés favorisant le développement ou la sélection d'une hématopoïèse clonale. D'après Danlos <i>et al</i> , La revue de médecine interne, 2019.....	34
Figure 7. A. Voies fréquemment dérégulées dans les LAM ainsi que les gènes associés. D'après Grove <i>et al</i> , Disease models and mechanisms, 2014. B. Graphique de Circos montrant les co-occurrences entre les voies dérégulées. D'après Graubert <i>et al</i> , American Society of Clinical Oncology Educational Book, 2014.....	37
Figure 8. Principe de l'effet Warburg. D'après Vander Heiden <i>et al</i> , Science, 2009.....	39
Figure 9. Effets des mutations IDH. D'après Rampal <i>et al</i> , Haematologica, 2016.....	43
Figure 10. Cartographie des voies métaboliques fonctionnelles dérégulées dans les LAM..	68
Figure 11. A. Principe d'une expérience RMN. Alignement des spins nucléaires dans le champ magnétique B0. B. Application du champ magnétique B1 perpendiculaire à B0 : perturbation de l'équilibre. C. Retour à l'équilibre, signal de temps et spectre.....	72

Figure 12. Méthode de RMN-HRMAS.....	73
Figure 13. Principe général d'un protocole de métabolomique.....	75
Figure 14. Principe de la GC-MS. Source : https://www.anthias.co.uk	81
Figure 15. Principe général d'un protocole de lipidomique.....	83
Figure 16. Quantification des acides gras totaux dans les cinq lignées cellulaires à l'état basal. **** $p < 0,0001$	149
Figure 17. A. Quantité d'acides gras totaux dans les lignées KG1 et K562 à l'état basal. B. Composition en acides gras totaux dans les lignées KG1 et K562 à l'état basal. **** $p < 0,0001$	150
Figure 18. A. Quantité d'acides gras totaux dans KG1 basal <i>versus</i> starvation. B. Composition en acides gras totaux dans KG1 basal <i>versus</i> starvation. C. Quantité d'acides gras totaux dans K562 basal <i>versus</i> starvation. D. Composition en acides gras totaux dans K562 basal <i>versus</i> starvation. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$	151
Figure 19. Quantification des espèces lipidiques dans les lignées KG1 et K562 en conditions basales. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$	152
Figure 20. Quantification des espèces lipidiques dans la lignée KG1 en conditions basales <i>versus</i> starvation. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$	153
Figure 21. Quantification des espèces lipidiques dans la lignée K562 en conditions basales <i>versus</i> starvation. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$	154
Figure 22. A. Quantité d'acides gras totaux dans les plasmas des patients de pronostic favorable <i>versus</i> défavorable. B. Composition en acides gras totaux dans les plasmas de patients de pronostic favorable <i>versus</i> défavorable.....	155
Figure 23. Quantification des espèces lipidiques dans les plasmas de patients de pronostic favorable (n = 5) et défavorable (n = 5). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$	156

Figure 24. Quantité de phospholipides (A) et de lipides neutres (B) dans les plasmas des patients de pronostic favorable (n = 3) <i>versus</i> défavorable (n = 3).....	157
Figure 25. Composition en acides gras pour les spots lipidiques correspondants aux phospholipides. A. Sphingomyéline; B. Phosphatidyl-choline; C. Phosphatidyl-inositol; D. Phosphatidyl-éthanolamine. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.....	157
Figure 26. Concentration d'alanine dans les lignées K562 (A) et KG1 (B) dans les conditions basales (NT), de privation en sérum (SS) et de privation en glucose avec ajout de 2-déoxyglucose (GS + 2-DG). La concentration est représentée en pourcentage relatif par rapport à celle de l'état basal. * p < 0,05, ** p < 0,01, **** p < 0,0001.....	158
Figure 27. Représentation du ratio P-AMPK/AMPK total dans les lignées K562 et KG1 dans les conditions basales, de privation en sérum (SS) et de privation en glucose avec ajout de 2-déoxyglucose (GS + 2-DG).....	150
Figure 28. Western blot représentant l'étude de P-AMPK, AMPK total, P-S6RP, S6RP total et LKB1 dans les lignées K562 et KG1 dans les conditions basales (NT), de privation en sérum (SS) et de privation en glucose avec ajout de 2-déoxyglucose (GS + 2-DG).....	160
Figure 29. Aperçu global du réseau métabolique dans les LAM. La figure est une représentation schématique issue de la littérature et de nos recherches, basée sur les enzymes métaboliques et les principales voies impliquées dans la progression des LAM..	183
Tableau I. Classification FAB.....	16
Tableau II. Expression des marqueurs cellulaires de surface et cytoplasmiques pour le diagnostic de LAM. D'après Döhner <i>et al</i> , Blood, 2010.....	18
Tableau III. Extrait de la classification de l'OMS 2016 listant les entités de LAM et leurs anomalies cytogénétiques associées. D'après Arber <i>et al</i> , Blood, 2016.....	20

Tableau IV. Stratification du risque basé sur la génétique. Recommandations de l'European LeukemiaNet (ELN) 2017. D'après Döhner <i>et al</i> , Blood, 2016.....	23
Tableau V. Catégories de lipides du système de classification et nombre de structures présentes dans la base de données LIPID MAPS®. D'après Fahy <i>et al</i> , Journal of Lipid Research, 2009.....	78

Liste des abréviations

2-DG : 2-déoxyglucose

2-HG : 2-hydroxyglutarate

ACL : ATP Citrate Lyase

ACP : Analyse en Composantes Principales

AG : Acides Gras

ALAT : Alanine Amino Transférase

AMPK : AMP-activated protein kinase

ASXL1 : Additionnal Sex Combs Like 1

CE : Cholestéryl-ester

CEBPA : CCAAT Enhancer-Binding Protein Alpha

CHIP : Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential

CIVD : Coagulation Intravasculaire Disséminée

CK : Choline Kinase

CL : Cardiolipine

CPT1 : Carnitine Palmitoyltransférase 1

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

CSL : Cellules Souches Leucémiques

DNMT3A : DNA Methyl-Transferase

ELN : European Leukemia Net

ETO : Eight-Twenty-One

FAB : French American British

FAME : Fatty Acid Methyl Ester

FAO : Fatty Acid Oxidation

FASN : Fatty Acid Synthase

FLT3 : Fms-Like Tyrosine kinase 3

GC-MS : Gas Chromatography-Mass Spectrometry

GLS : Glutaminase

GSH : Glutathion

HIF : Hypoxia Inducible Factor

HK : Hékokinase

HRMAS : High Resolution Magic Angle Spinning
IDH : Isocitrate déshydrogénase
ITD : Internal Tandem Duplication
LAM : Leucémie Aiguë Myéloïde
LDH : Lactate Déshydrogénase
LKB1 : Liver Kinase B1
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinases
MPO : Myélopéroxydase
MS : Spectrométrie de Masse
mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
NGS : Next Generation Sequencing
NOX : NADPH Oxidase
NPM1 : Nucleophosmin 1
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OPLS-DA : Orthogonal Projection to Latent Structure with Discriminant Analysis
PC : Phosphocholine
(P)C : Phosphatidyl-choline
PDC : Pyruvate Dehydrogenase Complex
PDK : Pyruvate Dehydrogenase Kinase
PE : Phosphoéthanolamine
(P)E : Phosphatidyl-éthanolamine
PI : Phosphatidyl-inositol
PI3K : Phosphatidylinositol-3-Kinase
PK : Pyruvate Kinase
PML-RARA : Promyelocytic leukemia gene-Retinoic Acide Receptor Alpha
PPP : Pentose Phosphate Pathway
PS : Phosphatidyl-sérine
RC : Rémission Complète
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
ROS : Reactive Oxygen Species
RUNX1 : Runt-related transcription factor 1
SM : Sphingomyéline

TAG : Triacylglycérol

TET2 : Ten Eleven Translocation 2

TP53 : Tumor Protein 53

WT1 : Wilms Tumor 1

α -KG : α -cétoglutarate

Revue générale de la littérature

1. Les leucémies aiguës myéloïdes

1.1. Généralités

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

1.2. Epidémiologie

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

1.3. Présentation clinique

La prolifération des blastes dans la moelle osseuse ainsi que leur accumulation dans d'autres organes entraînent l'apparition de signes cliniques généralement non spécifiques de la pathologie. Dans la majorité des cas, les patients présentent un

syndrome anémique, caractérisé par une diminution significative du taux d'hémoglobine (en général entre 5 à 12 g/dL), entraînant plusieurs symptômes tels que l'asthénie, la pâleur cutanéomuqueuse, une dyspnée, une tachycardie, des vertiges, etc. De plus, une thrombopénie – parfois majeure (< 10 G/L) – est fréquemment associée à l'anémie, entraînant des signes hémorragiques (épistaxis, gingivorragies, ménorragies, etc.), pouvant aller jusqu'à une coagulopathie de consommation (CIVD). Le nombre de leucocytes est très variable en fonction des cas, pouvant aller de la leucopénie franche (< 1 G/L) sans blastes circulants, entraînant des signes d'infection, jusqu'à l'hyperleucocytose majeure (100 à 500 G/L), pouvant entraîner une détresse respiratoire du fait de la leucostase.

1.4. Diagnostic biologique

1.4.1. *Myélogramme*

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

1.4.2. Morphologie des blastes

Pour pouvoir caractériser les blastes au niveau morphologique et cytochimique, la classification du groupe FAB, pour French-American-British, est utilisée. Dans cette classification, les LAM sont réparties en différents sous-types (LAM0 à LAM7), en fonction du « lineage » des cellules de la moelle osseuse duquel les blastes se rapprochent le plus par leurs critères morphologiques et cytochimiques³.

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

Tableau I. Classification FAB.

1.4.3. Cytochimie

L'étude cytochimique des cellules permet de rechercher un composant ou une enzyme particulière à une lignée ou à un stade de différenciation. Cette technique implique des colorations cytochimiques qui révèlent l'activité enzymatique que les

cellules possèdent comme les marqueurs de la myéloperoxydase (MPO) (**Figure 1**) et des estérases (butyrate estérase) (**Figure 2**). La positivité des MPO permet de différencier les LAM des LAL (Leucémies Aiguës Lymphoblastiques)⁴.

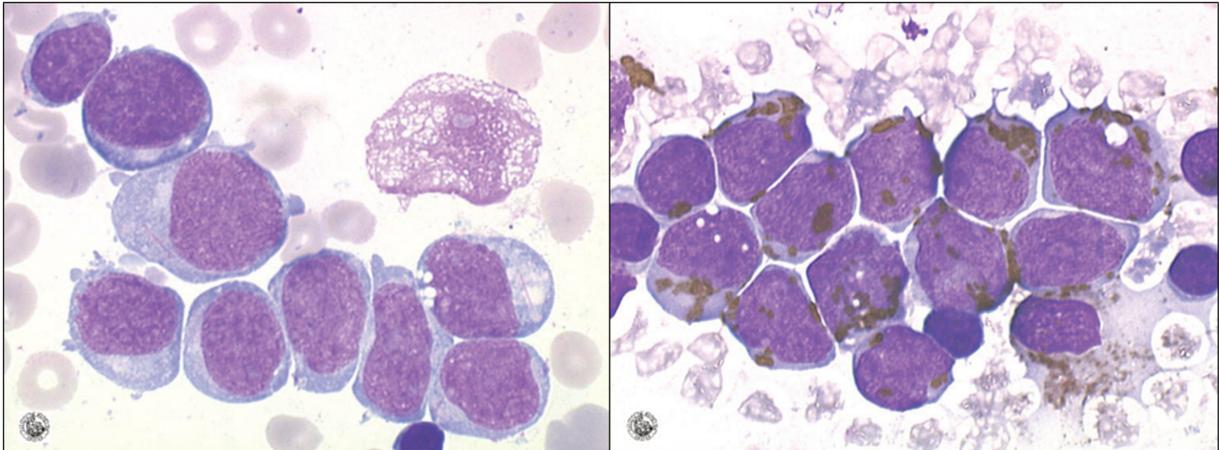


Figure 1. Blastes négatifs (gauche) et positifs (droite) pour la myéloperoxydase.

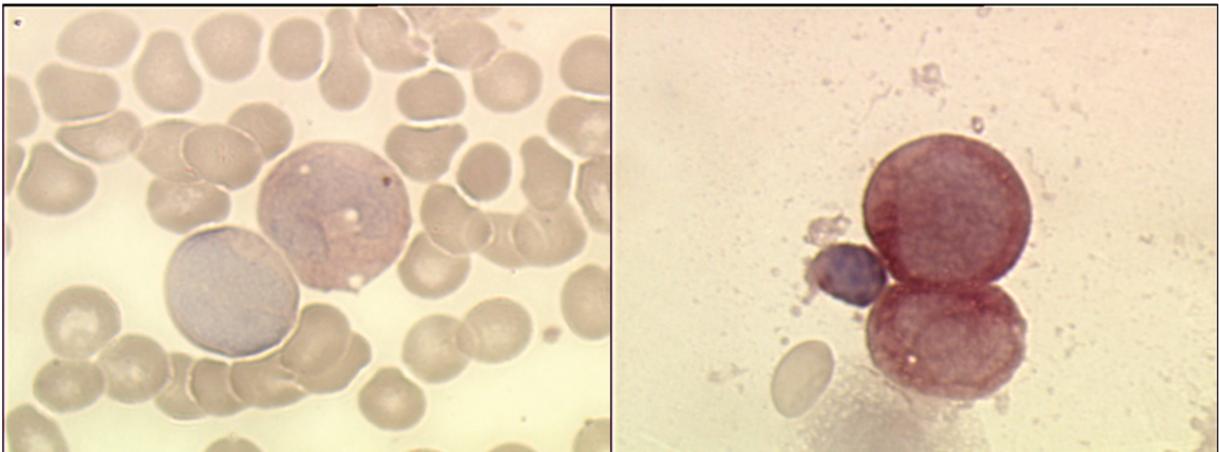


Figure 2. Monocytes et blastes négatifs (gauche) et positifs (droite) pour la butyrate estérase.

1.4.4. Immunophénotypage

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

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

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

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

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

Tableau II. Expression des marqueurs cellulaires de surface et cytoplasmiques pour le diagnostic de LAM.
D'après Döhner *et al*, Blood, 2010.

1.4.5. Anomalies cytogénétiques

La recherche d'anomalies cytogénétiques est également indispensable au diagnostic. Approximativement, la moitié des LAM présente une ou plusieurs

anomalies chromosomiques et l'autre moitié est cytogénétiquement normale. Plusieurs entités sont recensées par la classification des leucémies aiguës et néoplasmes myéloïdes, établie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), et révisée en 2016⁶ (**Tableau III**). Cette classification a permis d'individualiser de nouveaux sous-types de LAM qui se différencient par leurs caractéristiques cytogénétiques et/ou moléculaires mais également par des pronostics différents.

Parmi ces entités, on retrouve les LAM avec des anomalies cytogénétiques récurrentes, représentées par 4 anomalies majeures qui sont les translocations t(8;21), t(9;11), t(16;16) et t(15;17). La translocation t(8 ;21) implique le gène *RUNX1* (Runt-related transcription factor 1), qui code CBF α (Core Binding Factor alpha), et le gène *ETO* (Eight-Twenty-One). Les anomalies 11q23 (gène *MLL* (Mixed-Lineage Leukemia, renommé *KMT2A* pour lysine N-methyltransferase 2A) sont le plus souvent associées à des leucémies à composantes monocytaires (du type LAM4 ou LAM5 de la classification FAB). Les LAM avec l'anomalie inv(16) ou t(16;16) ont pour conséquence l'anomalie moléculaire CBF β -MYH11, et sont couramment associées aux LAM4 avec éosinophiles anormaux (LAM4eo)⁷. La translocation t(15 ;17) est particulière, et aboutit à une protéine de fusion PML-RARA (Promyelocytic leukemia gene-Retinoic Acide Receptor Alpha) qui permet l'utilisation de l'acide rétinoïque dans le traitement d'induction. Ce type d'anomalie est retrouvé dans les LAM3, qui sont souvent associés à un phénomène de CIVD⁸. Les différentes anomalies regroupées dans cette entité confèrent le plus souvent un pronostic favorable aux patients.

Il existe également d'autres entités, dont celle des LAM avec modifications génétiques liées à la myélodysplasie. Cette entité regroupe notamment les LAM à caryotype complexe (c'est-à-dire, présentant 3 anomalies ou plus), les LAM avec

anomalies déséquilibrées, telles que les délétions 5q ou 7q, et les LAM avec anomalies équilibrées (translocations)⁹. Ces anomalies sont responsables d'un pronostic plus défavorable pour les patients qui en sont porteurs. Il existe aussi les LAM avec modifications génétiques liées à la prise d'un traitement antérieur au diagnostic, ainsi que l'entité des LAM NOS (pour Not Otherwise Specified), qui comprend les LAM non définies par les anomalies citées précédemment. Ce sous-groupe reprend les entités identifiées dans la classification FAB.

Acute myeloid leukemia (AML) and related neoplasms

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

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

1.4.6. Anomalies moléculaires

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

Les mutations de *NPM1* surviennent dans environ 30% des LAM. *NPM1* est une protéine impliquée dans diverses fonctions, dont la biosynthèse des ribosomes et la réponse aux dommages à l'ADN. Les mutations du gène *FLT3* sont des mutations altérant les signaux de transduction. Il existe deux types de mutations : les duplications internes en tandem (*FLT3-ITD*) survenant dans 20 à 25% des LAM ; et les mutations ponctuelles dans le domaine tyrosine kinase (*FLT3-TKD*) survenant plus rarement, dans 7 à 8% des LAM. Ces mutations entraînent l'activation constitutive de plusieurs voies de signalisation telles que PI3K/AKT/mTOR (Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt/mammalian Target Of Rapamycin) ou la voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases). De plus, le facteur de transcription STAT5 (Signal transducer and activator of transcription 5) est également activé par *FLT3-ITD*. Les mutations avec perte de fonction de *CEBPA* sont présentes dans environ 10% des LAM. Elles sont impliquées dans le contrôle de la différenciation myéloïde. Les mutations de *DNMT3A*, *TET2* et *IDH* entraînent des modifications

épigénétiques. DNMT3A est altéré durant la leucémogénèse, les mutations de ce gène surviennent dans 30% des LAM, et majoritairement chez les patients à caryotype normal. L'enzyme TET2 catalyse l'oxydation de la 5-méthyl-cytosine en 5-hydroxy-méthyl-cytosine (5hmC), favorisant la déméthylation de l'ADN. TET2 est considéré comme un suppresseur de tumeur de par son inactivation via des mutations de perte de fonction dans les néoplasmes myéloïdes. Ces mutations sont présentes dans 20% des LAM. Les mutations survenant sur les gènes codant pour l'IDH 1 et 2 surviennent dans 15 à 20% des LAM et entraînent la production d'un oncométabolite, le 2-hydroxyglutarate (2-HG), conduisant entre autres à une hyperméthylation de l'ADN. Enfin, les mutations de WT1 surviennent dans moins de 10% des LAM. Ce sont des mutations avec perte de fonction, conduisant à une diminution des niveaux de 5hmC¹¹.

Ainsi, l'analyse du génome leucémique à partir des profils d'expression génique et des profils mutationnels permet d'incrémenter les classifications des patients en fonction de leur statut moléculaire. Très souvent, ces gènes que nous avons cités précédemment ne sont pas touchés de façon isolée. En effet, il est très fréquent d'observer des mutations combinées, et notamment les associations *IDH* et *NPM1*, *FLT3-ITD* ou *DNMT3A*¹² ou alors les associations *DNMT3A* et *NPM1*, *FLT3-ITD* ou *TET2*¹¹. A l'inverse, il est aussi possible d'observer des mutations qui s'excluent, comme par exemple *IDH* et *TET2*^{11,13,14}. De même, les mutations de *WT1* sont mutuellement exclusives des mutations *TET2* et *IDH1/2*¹¹. Cette hétérogénéité des mutations survenant dans les LAM à caryotype normal est très bien illustrée sur le schéma de Döhner *et al.* ci-dessous (**Figure 3**).

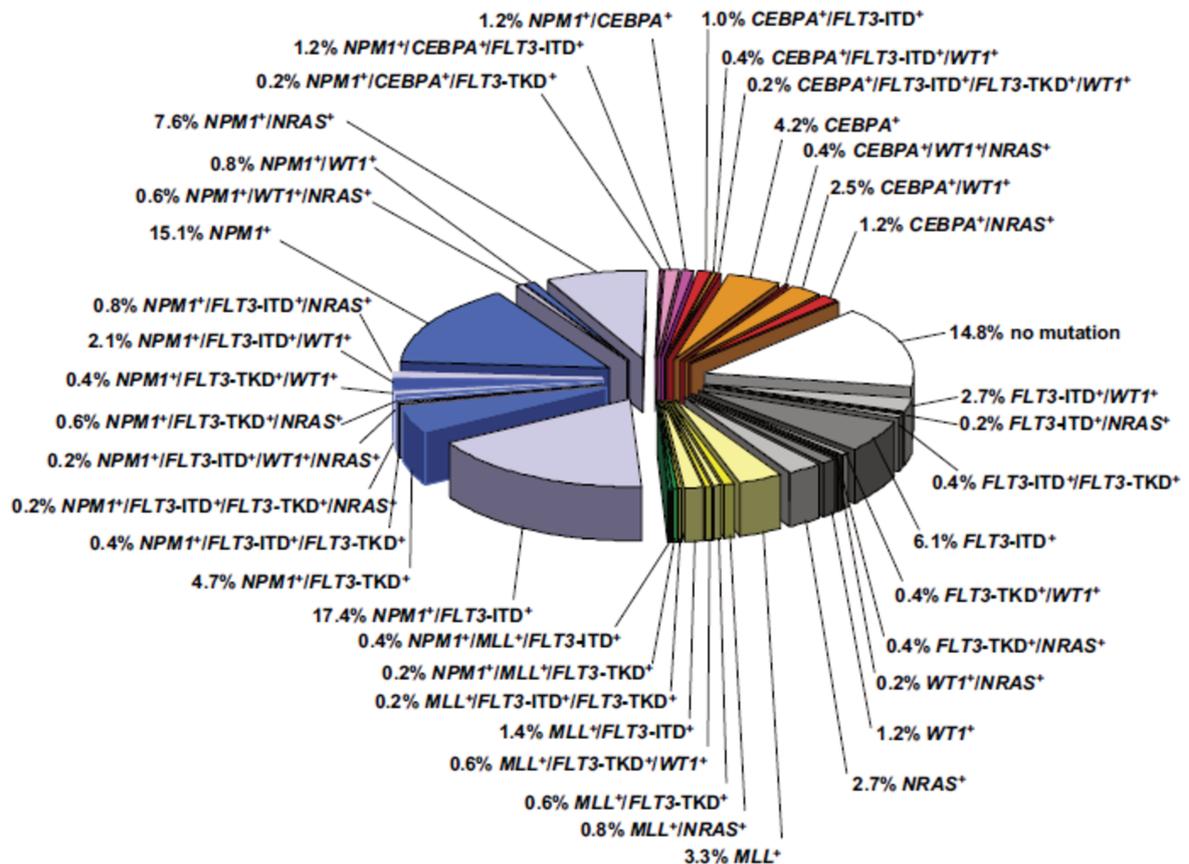


Figure 3. Hétérogénéité moléculaire des LAM à caryotype normal. D'après Döhner *et al*, Blood, 2010.

1.5. Facteurs pronostiques

Le pronostic des LAM est très péjoratif. La survie à 5 ans (excluant les LAM de type 3) est d'environ 35 à 40% pour les patients de 60 ans et moins, et de 5 à 15% pour les patients de plus de 60 ans¹⁵. L'ajout des données issues des analyses cytogénétiques et moléculaires permettent de classer les LAM au sein de la classification OMS, qui permet de classer les patients dans des sous-groupes pronostiques (favorable, intermédiaire et défavorable), qui vont déterminer les choix thérapeutiques telle que la place de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) ou la mise en œuvre de thérapies ciblées¹⁶. Des études

récentes ont évalué l'implication de certains facteurs cliniques et génétiques pour la prédiction de la survie globale chez les patients. Ces facteurs pronostiques peuvent être subdivisés en deux groupes : ceux liés aux patients et ceux liés à la maladie. Les facteurs associés aux patients, tels que l'âge avancé, le statut immunitaire peu performant ou encore l'existence de comorbidités, prédisent couramment une mort précoce liée au traitement, alors que les facteurs associés à la maladie, comme par exemple le taux de leucocytes, les antécédents de syndrome myélodysplasique, les thérapies cytotoxiques utilisées pour traiter d'autres pathologies ou les anomalies génétiques des cellules leucémiques prédisent la résistance à la chimiothérapie standard¹⁵.

Les données issues de l'analyse génétique ont permis d'identifier plusieurs nouveaux facteurs pronostiques puissants et la publication des critères de l'ELN permettant une stratification pronostique basée sur la génétique moléculaire (**Tableau IV**). Par exemple, les anomalies touchant les gènes *FLT3*, *CEBPA*, *NPM1*, *RUNX1*, *ASXL1* (Additional Sex combs Like 1) et *TP53* (Tumor Protein 53) qui améliorent la stratification pronostique des patients au diagnostic, et notamment des patients à caryotype normal. Les mutations touchant *FLT3*, et en particulier les mutations *FLT3*-ITD sont associées à une moins bonne survie globale, et particulièrement en l'absence de *NPM1*¹¹. Au contraire, *NPM1* et *CEBPA* sont associées à une nette amélioration de la survie chez les patients¹⁷. Cependant, l'impact pronostique de ces marqueurs génétiques dépend du contexte, l'effet d'une anomalie donnée dépendant de la présence ou non d'une autre anomalie. Par exemple la mutation *NPM1* est associée à un pronostic favorable seulement en l'absence de la mutation *FLT3*-ITD ou en présence d'une mutation *FLT3*-ITD avec un faible ratio allélique^{11,16}. Également, une LAM à caryotype normal avec *CEBPA* muté en l'absence de *FLT3*-

ITD a été identifiée comme présentant un risque pronostique similaire à celui des LAM avec des modifications cytogénétiques favorables¹⁸. A noter que la charge allélique du gène muté peut également impacter la survie. Ainsi, ce sont les mutations bi-alléliques de *CEBPA* qui sont de bon pronostic. D'autre part, les mutations de *RUNX1*, d'*ASXL1* et de *TP53* sont associées à une moins bonne survie chez les patients et une réponse défavorable à la chimiothérapie¹¹.

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

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

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

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

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

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

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

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

^h *TP53* mutations are significantly associated with AML with complex and monosomal karyotype.^{37,56-59}

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

1.6. Traitement

1.6.1. *Traitement standard*

L'approche générale concernant le traitement des LAM n'a pas fortement évolué depuis des dizaines d'années. Le traitement standard consiste à administrer une lourde chimiothérapie au patient, dans le but d'induire une rémission complète (RC) de la pathologie dans un premier temps, et aussi d'éviter les rechutes à plus long terme. La première phase du traitement est appelée phase d'induction. Avec trois jours d'anthracycline et sept jours de cytarabine (schéma communément appelé « 7+3 »), la RC est atteinte chez 60 à 80% des adultes de moins de 60 ans, et chez 40 à 60% des adultes plus âgés (60 ans et plus)¹³. Les critères de RC sont : un taux de polynucléaires neutrophiles > 1 G/L, un taux de plaquettes > 100 G/L et un pourcentage de blastes médullaires < 5%. Cette approche est souvent proposée aux patients de pronostic intermédiaire à favorable, et présentant un faible risque de mortalité liée au traitement¹⁹. Une réponse favorable au traitement d'induction doit être suivie d'un traitement de consolidation afin d'éradiquer toute maladie résiduelle et d'obtenir une rémission durable en prévenant les rechutes⁹. Ce traitement de consolidation peut consister en une autre cure de chimiothérapie, ou alors en une greffe allogénique de CSH. La LAM est l'indication la plus fréquente de greffe de CSH, avec une augmentation de 10% de greffes réalisées par an dans le monde²⁰. La décision de réaliser la greffe est prise en fonction du rapport bénéfice/risque pour le patient. De plus, ces greffes ne sont pas réalisées chez tous les patients. En effet, les patients classés comme ayant un pronostic défavorable selon l'ELN 2017 sont prioritaires, ainsi que les personnes âgées de plus de 60 ans après évaluation des éventuelles comorbidités associées, et ceux présentant un plus fort risque de

rechute, afin d'améliorer leurs chances de survie²¹. Il est également important de souligner le fait que l'allogreffe de CSH est le seul traitement potentiellement curatif chez les patients n'ayant pas été en RC après la phase d'induction, c'est-à-dire, les patients réfractaires au traitement par chimiothérapie standard.

Il existe un cas particulier, celui de la LAM3, appelée aussi leucémie aiguë promyélocytaire, qui est éligible au traitement par thérapie ciblée^{22,23}. Comme mentionné précédemment, cette entité de LAM a la particularité d'être caractérisée par une translocation t(15 ;17), aboutissant à une protéine de fusion PML-RARA, conférant la sensibilité de cette LAM à un traitement par acide tout-trans-rétinoïque, donnant d'excellents résultats en terme de rémission²⁴. Pour la plupart des autres types de leucémie, une telle thérapie à cible unique est vouée à l'échec principalement du fait de l'hétérogénéité génétique des cellules cancéreuses.

1.6.2. Nouveaux agents

Grâce à l'utilisation des nouvelles techniques de génomique telle que le NGS qui mettent en lumière de nouvelles altérations géniques, le développement de nouveaux agents ciblant ces anomalies a fortement augmenté depuis quelques années dans le traitement des LAM.

Parmi ces nouvelles molécules, nous retrouvons tout d'abord les inhibiteurs de FLT3. Les inhibiteurs de FLT3 de première génération comprennent les molécules suivantes : midostaurine, sorafénib, sunitinib et lestaurtinib ; ce dernier étant en cours d'essai clinique. Ces molécules sont indiquées dans le traitement des LAM *de novo* avec mutation du gène *FLT3*, en association avec une chimiothérapie standard^{25,26}. Il

existe aussi des inhibiteurs de FLT3 de seconde génération, représentés par les molécules suivantes : gilteritinib (approuvé en novembre 2018), crenolanib et quizartinib. Le crenolanib est en cours de développement clinique (essai de phase III)^{26,27}, et le quizartinib est disponible sur demande d'ATU nominative (Autorisation Temporaire d'Utilisation)²⁸.

Ensuite, des inhibiteurs d'IDH1/2 sont également disponibles, à savoir l'enasidenib²⁹, indiqué pour les patients présentant une mutation *IDH2* (disponible sur demande d'ATU), et l'ivosidenib (AG120), approuvé en juillet 2018²⁶. Les patients concernés par ce traitement sont ceux mutés pour *IDH1* non éligibles à la chimiothérapie intensive³⁰.

De plus, un anticorps monoclonal a été développé et approuvé depuis septembre 2017, le gemtuzumab ozogamicine, et est indiqué, en association avec une chimiothérapie standard, dans le traitement des LAM d'expression positive du CD33 *de novo*³¹. Il existe une autre molécule testée dans un essai clinique, le Flotetuzumab, dirigé contre le CD123, et visant les patients en rechute ou réfractaire au traitement standard³².

Depuis peu, le vénétoclax, un inhibiteur de la protéine BCL-2 (B Cell Lymphoma 2) – jusqu'alors utilisé dans le traitement des leucémies lymphoïdes chroniques – est en cours d'essai clinique en monothérapie chez des sujets atteints de LAM²⁶.

Enfin, de nouvelles thérapies cellulaires, les CAR-T cells (Chimeric Antigen Receptor), sont à l'étude depuis quelques années, utilisant des cellules T modifiées avec des récepteurs d'antigènes chimériques³³. Plusieurs études sont en cours dans divers pays, mais il n'y a pas assez de recul sur ces nouvelles thérapies dans le traitement des LAM pour le moment.

1.7. Physiopathologie et leucémogénèse

1.7.1. *Facteurs prédisposants*

Il existe plusieurs types de facteurs prédisposant à cette pathologie. En premier lieu, les personnes exposées aux radiations ionisantes et cosmiques, ainsi que les personnes travaillant dans les industries nucléaires sont très concernées par un risque accru de développer une LAM. Également, l'exposition au benzène et au tabagisme chronique entraîne une forte incidence de cette pathologie dans la population. De plus, les LAM peuvent être secondaires à une chimiothérapie administrée des années auparavant, comme par exemple les traitements à base d'agents alkylants ou d'inhibiteurs des topoisomérases II tels que l'étoposide ou la doxorubicine. Enfin, la prédisposition génétique, de type trisomie 21 ou neurofibromatose, explique quelques cas de LAM chez l'enfant et l'adulte³⁴.

Cependant, dans la majorité des cas, la pathologie apparaît comme une pathologie maligne *de novo*, chez des individus auparavant sains. Quelle que soit son étiologie, la pathogénèse de la LAM implique un clone issu d'une cellule souche myéloïde⁹ bloquée à un stade précoce de sa différenciation dans laquelle l'accumulation d'anomalies moléculaires seules ou en association entraîne la prolifération incontrôlée.

1.7.2. *Anomalies moléculaires*

Les approches par NGS ont permis de caractériser le « paysage » des anomalies génétiques présentes dans les LAM. Les chercheurs du projet « The Cancer

Genome Atlas » ont identifié 23 gènes ayant une prévalence de mutation bien plus élevée que prévue, incluant notamment les gènes importants et nécessaires à la pathogenèse des LAM (*FLT3*, *NPM1*, *DNMT3A*, *IDH* et *CEBPA*). Grâce au séquençage approfondi, la composition clonale de chaque échantillon tumoral a pu être définie. L'étude a ainsi montré que plus de la moitié des clones leucémiques contenaient à la fois un clone fondateur et au moins un sous-clone, allant même parfois jusqu'à 3 sous-clones indépendants dans un échantillon¹⁰ (**Figure 4**). L'architecture clonale et l'ordre d'apparition des mutations peuvent être déduites par les fractions de l'allèle variant (VAF) de chaque gène.

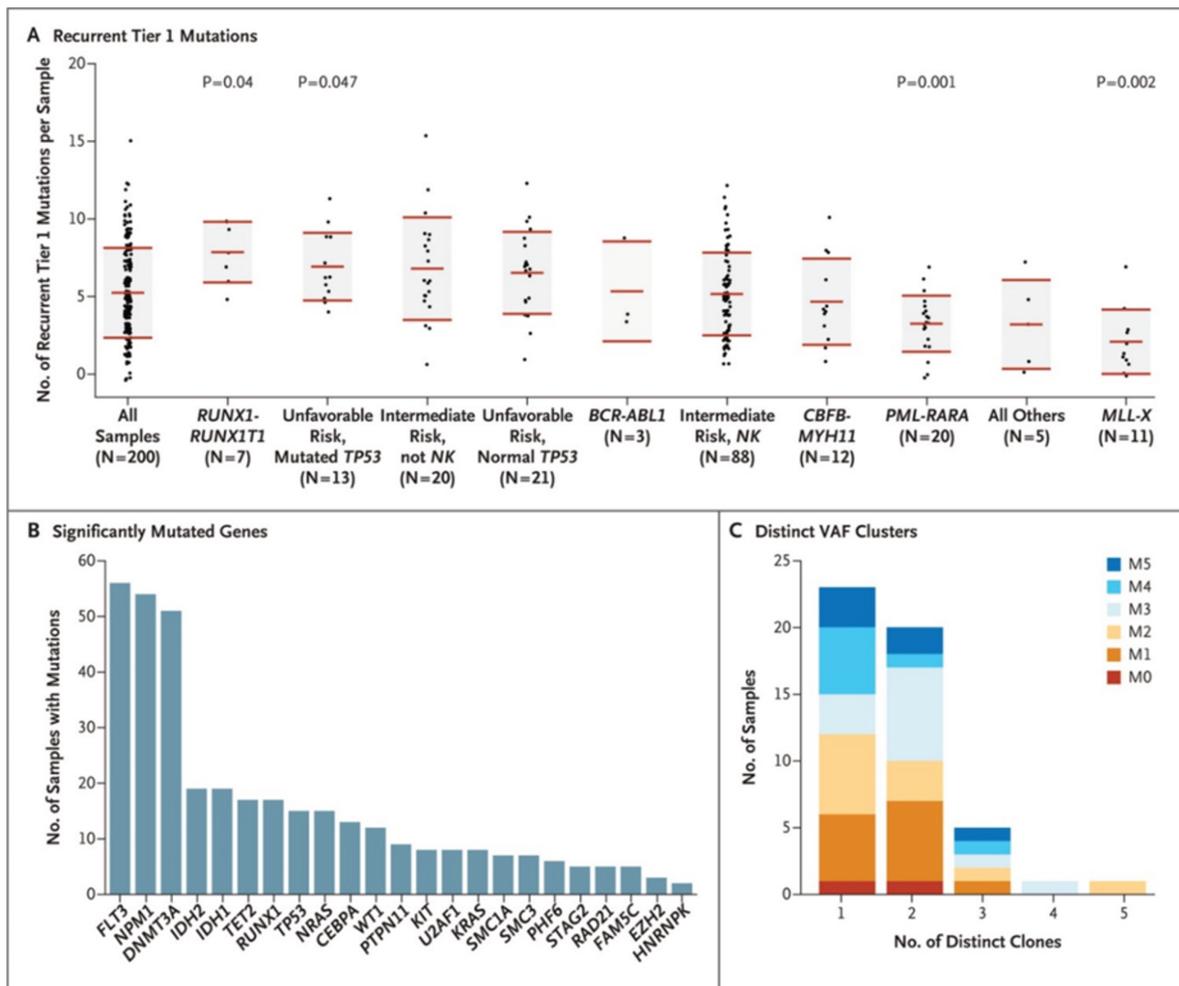


Figure 4. Caractérisation des mutations découvertes dans les LAM. D'après l'équipe de recherche du projet « The Cancer Genome Atlas », NEJM, 2013.

Ces travaux ont montré qu'une seule mutation sur un gène n'est pas suffisante pour induire un phénotype leucémique mais que plusieurs anomalies moléculaires participent à l'émergence et au développement du clone leucémique, comme par exemple les mutations « loss-of-function » de *RUNX1*, ou bien les mutations du gène *CEBPA*³⁵. Il s'agit toujours d'une coopération entre plusieurs mutations qui peuvent entraîner et favoriser le développement de cellules leucémiques à partir de CSH normales. Parmi ces mutations, on en retrouve certaines qui surviennent à un stade très précoce de la leucémie, appelé état pré-leucémique. Il s'agit par exemple des

mutations des gènes *DNMT3A*, *ASXL1* ou *TET2* qui sont considérées comme des mutations « driver »^{15,26}. Des mutations secondaires affectant les facteurs de transcription apparaissent ensuite, tels que les gènes de fusion résultant des t(8 ;21), t(15 ;17) ou encore les mutations de *NPM1*, entraînant une perturbation du processus de différenciation cellulaire et une acquisition aberrante de propriétés d'auto-renouvellement cellulaire par les progéniteurs hématopoïétiques³⁵. Cette évolution clonale aboutit à la formation de cellules souches leucémiques (CSL) (Figure 5).

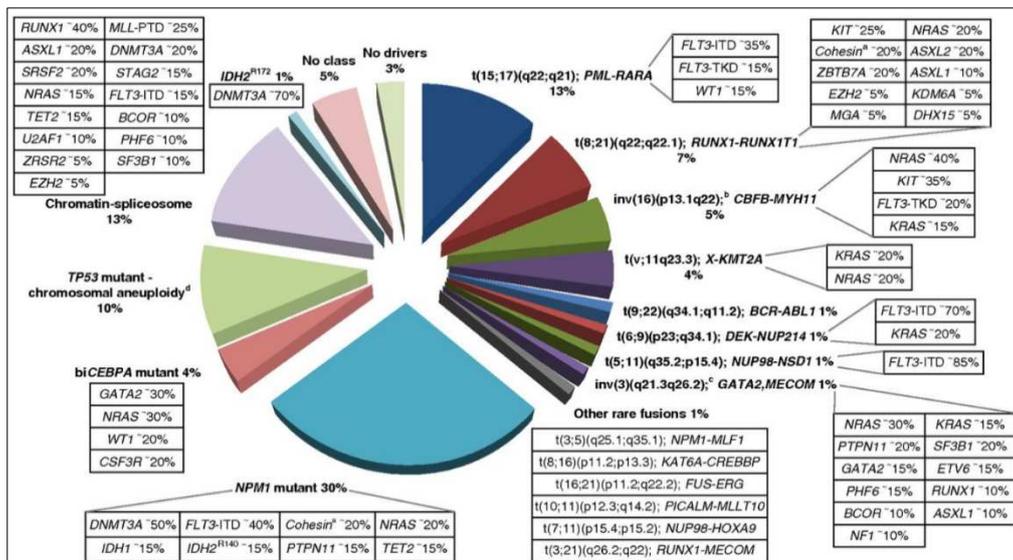


Figure 5. Distribution de sous-types de LAM définis au niveau cytogénétique et moléculaire. D'après Grimwade *et al*, Blood, 2016.

De plus, le NGS a permis de mettre en évidence l'existence de cellules souches dans la moelle osseuse de patients non atteints de LAM, caractérisées par des mutations somatiques dans les gènes *driver* associés à la leucémie, définissant la présence d'une hématopoïèse clonale pré-leucémique (CHIP : Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential). La prévalence des CHIP évolue avec l'âge puisque

seulement 0,3% des patients de moins de 40 ans présente une hématopoïèse clonale contre 10% après 70 ans. Ces mutations confèrent un avantage de croissance ou de prolifération et entraînent l'expansion d'un clone génétiquement identique des cellules de moelle osseuse et sanguines. En revanche, elles n'aboutissent pas forcément à l'émergence d'une LAM *de novo*. Pour pouvoir parler de CHIP, le seuil de proportion du variant doit être supérieur à 2%. Plus le seuil est élevé, plus le clone a un risque d'évoluer vers une hémopathie. Un seuil trop bas n'est pas prédictif pour déterminer le risque d'évolution du clone. En présence d'une cytopénie sur la numération formule sanguine, le terme CHIP est remplacé par le terme « ICUS », pour cytopénie idiopathique de signification indéterminée, ou « UCUS » pour cytopénie clonale de signification indéterminée. Le clone peut ensuite évoluer vers un syndrome myélodysplasique (SMD), qui dans 30% des cas évolue vers une LAM³⁶.

Le terme « Indeterminate Potential » reflète le caractère imprévisible de l'évolution de ces clones mais souligne également que d'autres éléments participent à la façon dont un CHIP va progresser chez un individu³⁷. Parmi les éléments qui influencent cette évolution, on retrouve l'âge, le stress oxydatif (notamment induit par une exposition à divers toxiques, radiothérapie ou chimiothérapie) et les différents épisodes inflammatoires et infectieux (aigus ou chroniques) (**Figure 6**).

Le type d'anomalie générée conditionne le risque d'évoluer vers une LAM. En effet, certaines mutations vont générer un clone très compétitif, qui a un risque élevé d'évolution vers une LAM. Par exemple, la présence d'un clone portant une mutation de *TP53*, *IDH1/2* est associée à un risque très élevé tandis qu'une CHIP avec *DNMT3A* a un risque d'acutisation plus faible. Les cellules souches portant des mutations de *DNMT3A* ont montré un avantage de repopulation sur plusieurs lignées

par rapport aux cellules non mutées, établissant leur identité en tant que cellules souches pré-leucémiques. *DNMT3A* arrive précocement dans l'évolution de la LAM, conduisant à une expansion clonale du pool de cellules pré-leucémiques à partir duquel la LAM évolue³⁸.

Ainsi, un modèle de leucémogénèse peut être défini, par acquisition séquentielle de mutations. Il existe une mutation initiatrice dans une CSH, qui va entraîner le développement de l'hématopoïèse pré-leucémique ; puis, une accumulation secondaire de mutations dans le clone pré-leucémique va transformer la LAM en maladie très proliférative³⁹.

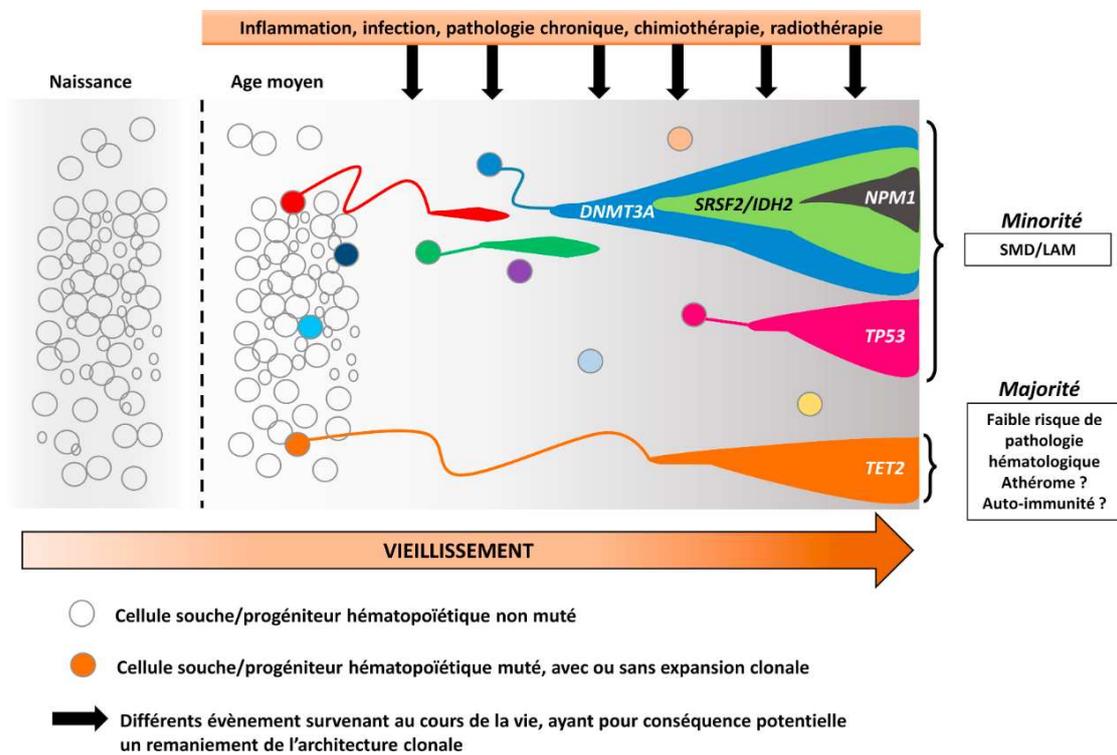


Figure 6. Facteurs suspectés favorisant le développement ou la sélection d'une hématopoïèse clonale. D'après Danlos *et al*, La revue de médecine interne, 2019.

1.7.3. Caractéristiques des cellules souches leucémiques

Les CSL sont au sommet de la hiérarchie cellulaire qui initie et maintient la maladie. Elles ont des propriétés d'auto-renouvellement et de quiescence du cycle cellulaire qui leur permettent de se maintenir dans l'environnement hématopoïétique⁴⁰. Les CSL présentent un phénotype de surface aberrant, caractérisé par un phénotype CD34⁺/CD38⁻, qu'elles ont en commun avec les CSH, et par les marqueurs CD123⁺/CD117⁻/CD13⁺ et qui les différencient de ces dernières. Parmi les caractéristiques fonctionnelles des CSL, Farge et al ont mis en évidence une résistance à la chimiothérapie, une surexpression de CD36 ainsi qu'une signature OXPHOS (Oxidative Phosphorylation) particulière⁴¹. Une autre étude montre que le fait que les CSL dépendent de la phosphorylation oxydative est relié au métabolisme de certains acides aminés qui seraient prédominants dans les CSL⁴². De plus, les CSL ont des faibles niveaux de ROS (Reactive Oxygen Species), qui résultent apparemment d'une faible activité mitochondriale combinée à une autophagie élevée dans ces cellules^{42,43}. Enfin, il semblerait que l'augmentation de l'activité de signalisation de la voie AMPK (AMP-activated protein kinase) serait une stratégie importante dans le maintien de la survie des CSL⁴³.

Toutes les CSL existent dans une niche, qui les nourrit et influence leur destin et celui des cellules en aval. Les CSL, tout comme les CSH interagissent avec un microenvironnement complexe multicellulaire dans la moelle osseuse, qui les module et qui comprend à la fois des cellules hématopoïétiques et plusieurs types de cellules non hématopoïétiques. Il est devenu évident que les interactions bidirectionnelles entre les cellules leucémiques et leur niche jouent un rôle dans l'initiation et le développement des hémopathies malignes. Parmi les dérégulations de la niche

observées dans les LAM, on peut citer par exemple des lésions vasculaires, une augmentation de l'angiogenèse ou encore la prolifération de cellules mésenchymateuses anormales⁴⁴. De plus, il existe des dérégulations des voies d'auto-renouvellement dans les CSL, dues notamment aux gènes *HOX* très souvent dérégulés dans les LAM. Enfin, elles peuvent stopper le processus d'apoptose, car elles sont fortement dépendantes de la voie de signalisation NF-κB (Nuclear Factor-κB), constitutivement active dans les LAM⁴⁵. Cette voie induit des signaux de croissance, de survie cellulaire et enfin d'invasion cellulaire au détriment du processus apoptotique.

1.7.4. Dérégulations fonctionnelles associées

La génétique moléculaire, au-delà de la description de plus en plus précise des anomalies moléculaires associées aux LAM, a permis également de mettre en évidence que de nombreuses fonctions cellulaires peuvent être dérégulées du fait de la présence de ces altérations moléculaires, et ainsi influencer l'évolution clonale des CSL. Tout d'abord, les mutations survenant sur les gènes *FLT3*, *RAS* ou *KIT* par exemple, vont entraîner une activation des voies de transduction du signal cellulaire^{26,35}, conférant aux cellules porteuses de ces mutations un avantage prolifératif *via* l'activation anormale de ces voies de signalisation¹⁵. Ensuite, les régulateurs de la différenciation cellulaire peuvent être réprimés par les gènes de fusion oncogéniques, tels que *PML-RARA* ou encore *AML1-ETO*⁴⁵. Les mutations des gènes impliqués dans le contrôle épigénétique de l'expression des gènes, tels que *ASXL1*, *DNMT3A*, *IDH* ou encore *TET2*, vont entraîner des dérégulations de la structure de la chromatine (*via* des modifications chimiques des histones) ou des

anomalies de la méthylation de l'ADN¹⁵. Enfin, ces anomalies peuvent toucher le métabolisme cellulaire. L'exemple le plus décrit dans les LAM est les mutations *IDH1* et *IDH2*, qui conduisent à la production de 2-HG, au détriment de l' α -cétoglutarate (α -KG). Considéré comme un oncométabolite, l'augmentation de 2-HG va impacter les fonctions métaboliques de la cellule leucémique, favorisant sa prolifération au détriment de la différenciation hématopoïétique normale. De plus, l'expression des mutants *IDH* altère la fonction catalytique de *TET2* dans les cellules, entraînant une hyperméthylation de l'ADN qui perturbe la différenciation des cellules myéloïdes⁴⁶. Au total, neuf catégories fonctionnelles distinctes (**Figure 7**) associées à des fonctions biologiques ayant un rôle probable dans la physiopathologie des LAM ont pu ainsi être identifiées.

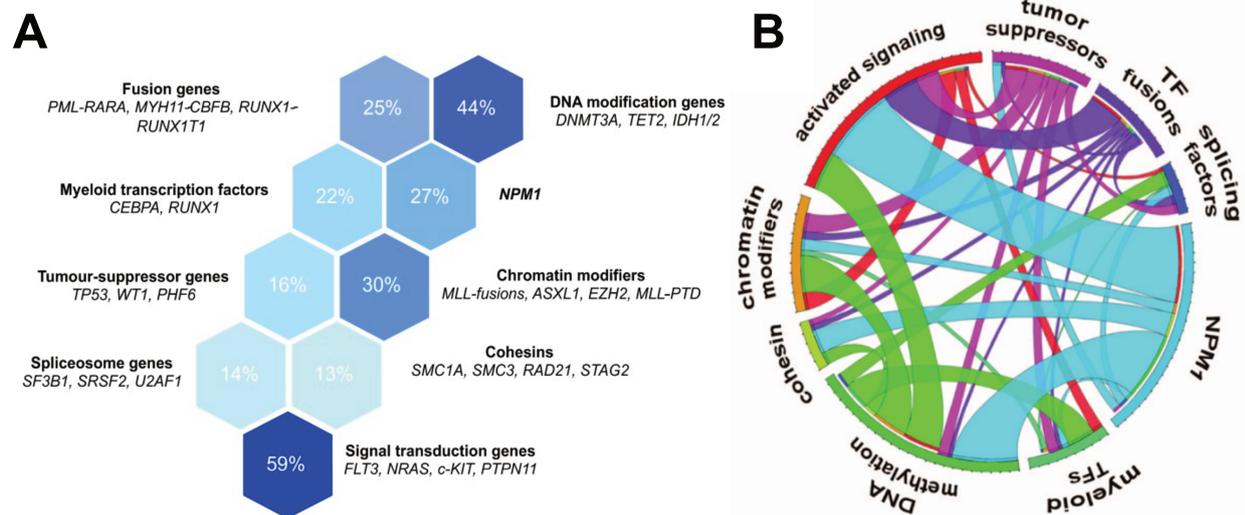


Figure 7. A. Voies fréquemment dérégulées dans les LAM ainsi que les gènes associés. D'après Grove *et al*, Disease models and mechanisms, 2014. **B.** Graphique de Circos montrant les co-occurrences entre les voies dérégulées. D'après Graubert *et al*, American Society of Clinical Oncology Educational Book, 2014.

2. Les dérégulations métaboliques

2.1. Dans les cancers

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

2.1.1. *L'effet Warburg*

Les cellules cancéreuses ont acquis des mécanismes qui leur permettent de reprogrammer leur métabolisme⁴⁷. Parmi eux, le plus connu est l'effet Warburg, décrit dans les années 1920 par Otto Heinrich Warburg. En présence d'oxygène dans leur environnement, les cellules normales utilisent la phosphorylation oxydative *via* les mitochondries afin de produire de l'énergie nécessaire à leur développement. En l'absence d'oxygène, elles utilisent la glycolyse anaérobie pour maintenir leur prolifération. Quelles que soient les conditions d'oxygénation de l'environnement, les cellules cancéreuses utilisent préférentiellement la glycolyse aérobie, en consommant énormément de glucose qui sera converti en lactate, pour produire de l'énergie et entretenir la prolifération cancéreuse. Cette adaptation métabolique irréversible est appelée « Effet Warburg ». (**Figure 8**). La production de lactate

survient partout dans l'environnement cellulaire, et est 10 à 100 fois plus rapide que l'oxydation du glucose.

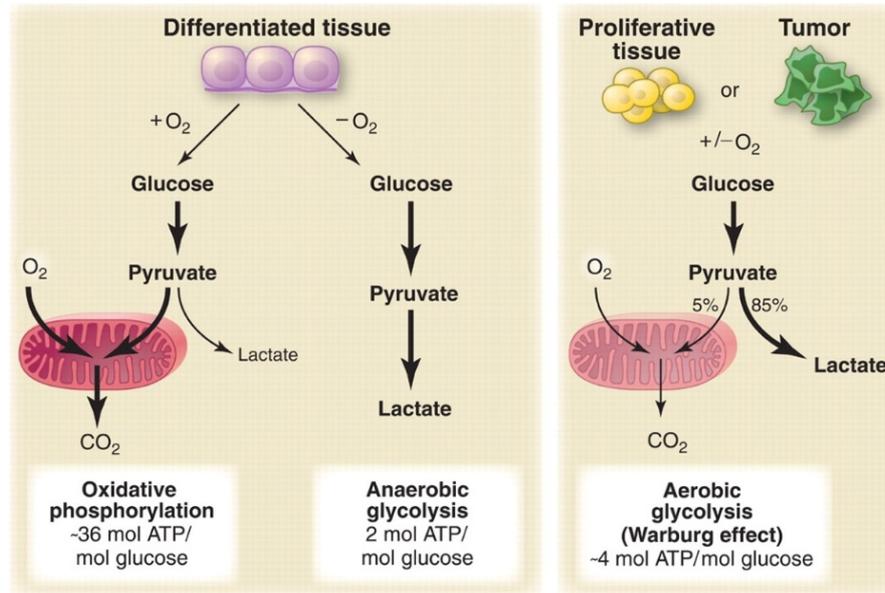


Figure 8. Principe de l'effet Warburg. D'après Vander Heiden *et al*, Science, 2009.

L'augmentation de la glycolyse et de la fermentation lactique, tout en diminuant simultanément l'oxydation mitochondriale, permet aux cellules d'équilibrer leurs besoins énergétiques et leur capacité à se diviser. Néanmoins, cette voie est moins efficace que la phosphorylation oxydative pour générer de l'ATP. Les cellules qui fonctionnent sous l'effet Warburg produisent environ 20 fois moins d'ATP par molécule de glucose consommée, que celles utilisant la respiration oxydative. Les cellules cancéreuses choisissent tout de même la glycolyse aérobie pour permettre le détournement des produits intermédiaires de la glycolyse vers les voies de biosynthèse permettant de générer des nucléotides, des lipides ou encore des acides aminés nécessaires à la croissance et à la division cellulaire⁴⁸. Ceci permet un apport rapide des constituants essentiels à la formation de futures cellules filles, et aussi une prolifération cellulaire plus efficace⁴⁹.

L'effet Warburg est considéré comme un évènement primaire dans l'oncogenèse. La reprogrammation métabolique de cet effet est conduite par plusieurs oncogènes et suppresseurs de tumeurs. La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR est particulièrement corrélée aux dérégulations métaboliques observées. La PI3K peut directement augmenter l'apport en glucose et le métabolisme *via* des mécanismes variés tels que l'augmentation de transporteurs de glucose dans la membrane plasmique et par l'augmentation des activités enzymatiques de l'héxokinase (HK) et des phosphofruktokinases. AKT régule la croissance cellulaire et la prolifération *via* la phosphorylation de nombreux effecteurs de transduction du signal ; et mTOR, *via* ses deux sous unités mTORC1 et mTORC2, régule positivement les synthèses protéique et lipidique ainsi que le métabolisme du glucose⁴⁸. La haute activité oncogénique d'AKT et mTOR dans les cellules tumorales va ensuite promouvoir l'expression de HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor), conduisant à une transcription persistante des enzymes qui contrôlent la glycolyse et la production de lactate. Enfin, il est décrit que différents oncogènes tels que *RAS* ou *MYC*, peuvent réguler positivement l'effet Warburg et donc promouvoir la glycolyse aérobie chez les cellules cancéreuses⁵⁰. Au niveau métabolique, l'augmentation de la consommation de glucose due à l'effet Warburg peut favoriser les réactions anaboliques telles que la lipogenèse *de novo*. De plus, cet effet peut induire une modulation du signal cellulaire en faveur de la tumorigenèse *via* les espèces réactives de l'oxygène⁵¹.

2.1.2. Le métabolisme du glucose

L'entrée du glucose dans la cellule ainsi que son utilisation est régulée par des transporteurs tels que GLUT1 (Glucose Transporter)⁴⁸. Ce transporteur du glucose

est largement décrit comme étant surexprimé dans les cancers⁵² et ceci est fortement corrélé à un mauvais pronostic. Il est régulé par des voies métaboliques telles que HIF ou PI3K/AKT. Parmi les enzymes catalysant les diverses réactions de la glycolyse, plusieurs sont fortement dérégulées. L'HK est présente sous différentes isoformes. HK2 est régulée positivement dans les cancers, ce qui conduit au couplage de la glycolyse et de la phosphorylation oxydative en augmentant le flux de glucose dans d'autres voies métaboliques⁴⁸. L'enzyme pyruvate kinase (PK) catalyse l'étape finale de la glycolyse. Parmi ses 4 isoformes, PKM2 est la forme dominante, prépondérante dans les cellules cancéreuses. Elle présente une activité catalytique plus faible que l'isoforme PKM1 mais l'élévation du flux glycolytique est bien associée à cette forme moins active⁵³. Cela crée une accumulation d'intermédiaires de la glycolyse pouvant être acheminés dans les voies de biosynthèse nécessaires à la prolifération cellulaire cancéreuse. Cette enzyme peut être considérée comme un biomarqueur potentiel de détection précoce des tumeurs⁴⁸.

De façon similaire à la voie glycolytique médiée par PKM2, certaines cellules tumorales peuvent réguler positivement l'absorption du glucose et renforcer la voie des pentoses phosphate (PPP) non oxydative *via* l'oncogène *KRAS*. En tant que voie alternative pour fournir aux cellules cancéreuses des précurseurs de biosynthèse de nucléotides, la PPP non oxydative augmente pour produire plus de ribose-5-phosphate. Dans ce contexte, l'enzyme glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) joue un rôle essentiel dans l'équilibre de la biosynthèse des nucléotides *via* la PPP et de la production d'énergie *via* le cycle de Krebs⁵³.

Le glucose peut être stocké sous forme de glycogène dans les tumeurs, *via* l'activité de la glycogène synthase qui est inhibée à travers la phosphorylation de GSK3 (Glycogen Synthase Kinase-3). GSK3 a un rôle suppresseur et est inhibée par la

voie de signalisation PI3K/AKT. La conséquence est que les cellules cancéreuses vont stocker le glycogène en quantité anormale, glycogène qui pourra être réutilisé par les cellules lorsque leur environnement sera appauvri en glucose⁵⁴.

La glycolyse continue lorsque l'oxygène est absent. L'absorption du glucose, ainsi que la production de lactate associée, sont augmentées dans les tumeurs indépendamment de l'hypoxie. La fermentation lactique permet la réduction du pyruvate en lactate *via* la Lactate déshydrogénase (LDH), ce qui représente un pourcentage plus élevé de glucose métabolisé dans les tumeurs. De plus, dans les cellules cancéreuses, l'expression de LDHA, une sous-unité de LDH, est augmentée et conduit à l'augmentation de la quantité de NAD⁺ produit, permettant à la glycolyse de continuer. D'autre part, le pyruvate produit par la glycolyse et non utilisé pour la production du lactate peut être décarboxylé par le complexe PDC (Pyruvate Dehydrogenase Complex), et converti en acétyl-coA, qui va alors entrer dans la mitochondrie et intégrer le cycle de Krebs⁴⁸. Ce PDC est régulé par l'enzyme PDK-1 (Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1), dont la surexpression dans les cancers est liée aux dérégulations des voies métaboliques AKT et HIF⁵⁵. De par l'action des cellules cancéreuses, PDK-1 peut être continuellement surexprimée pour activer le PDC, qui contribue aux altérations glycolytiques décrites dans les cancers⁴⁸.

2.1.3. *Le cycle de Krebs*

Les réactions biochimiques dans le cycle de Krebs sont catalysées par un certain nombre d'enzymes. Des études récentes montrent que certaines de ces enzymes sont mutées ou dérégulées dans plusieurs types de cancers, entraînant des

modifications métaboliques et épigénétiques caractéristiques, corrélées à la transformation et à la progression de la maladie⁵⁶.

La famille des enzymes IDH comprend plusieurs isoformes qui transforment l'isocitrate en α -KG. Les mutations de l'*IDH* dans les cancers entraînent la conversion de l' α -KG en 2-HG, considéré alors comme un oncométabolite. Ce que l'on appelle « oncométabolite » est un métabolite dont l'abondance est augmentée dans les cellules cancéreuses, et dont l'implication est prouvée dans le développement de cellules malignes⁴⁷. Ces mutations somatiques induisent un phénotype associant une hyperméthylation de l'ADN *via* la diminution de l'activité enzymatique de *TET2*⁵⁷ (**Figure 9**), ainsi qu'une dérégulation de la production de ROS et de l'équilibre redox, dus à une altération du ratio NADPH/NADP⁺⁵⁸. De plus, la présence de cet oncométabolite entraîne des modifications dans l'expression des gènes, ainsi que des dérégulations de HIF-1 α ⁵⁹.

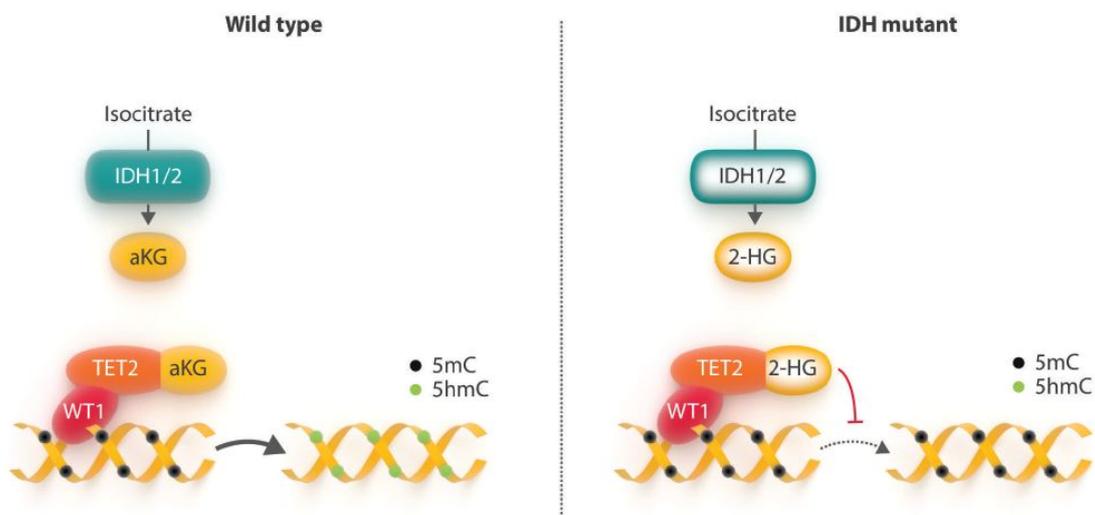


Figure 9. Effets des mutations IDH. D'après Rampal *et al*, Haematologica, 2016.

D'autre part, il y a deux autres enzymes du cycle de Krebs qui peuvent être mutées dans les cancers ; il s'agit de la SDH (Succinate Déshydrogénase) et de la FH (Fumarate Hydratase). Ces deux enzymes sont considérées comme des suppresseurs de tumeurs, l'une convertit le succinate en fumarate (SDH) et l'autre le fumarate en malate (FH). Lorsqu'elles sont mutées, elles deviennent inactives, et ne peuvent plus effectuer leur mission de conversion des métabolites. Il en résulte donc une accumulation de succinate et de fumarate dans la mitochondrie, qui vont agir comme des inhibiteurs compétitifs des HIF-1 α prolyl hydroxylases, et entraîner ainsi une stabilisation de HIF-1 α . Ceci aura pour conséquence d'activer la transcription de gènes tumoraux, conduisant à une hyperméthylation des histones et de l'ADN⁴⁸.

2.1.4. Le métabolisme de la glutamine

La glutamine est essentielle à la prolifération des cellules cancéreuses. Dans certains cancers, les cellules sont même caractérisées par une addiction à la glutamine⁶⁰. Le flux de glutamine est régulé par SLC1A5 (Solute Carrier) – qui est le transporteur majeur de glutamine dans les cancers – et qui régule également l'activation de mTOR. Une concentration élevée de glutamine dans le milieu extracellulaire fournit l'énergie nécessaire à la croissance et à la survie des cellules cancéreuses⁴⁸.

L'oncogène *MYC* a été décrit comme capable d'augmenter le métabolisme de la glutamine, en régulant positivement l'expression de la glutaminase (GLS) qui conduit à une augmentation de la production de glutamate, entraînant *a fortiori* une

augmentation de l' α -KG entrant dans le cycle de Krebs⁶¹. Cela suggère donc que l'induction de *MYC* favorise la glutaminolyse dans les cancers⁶².

Le métabolisme de la glutamine dans les cellules cancéreuses entraîne d'autres modifications, telles qu'une augmentation du stress oxydatif, des dysfonctions métaboliques, une potentialisation de l'effet Warburg, une réduction de l'activité du PDC qui convertit le pyruvate en acétyl-coA, une augmentation de l'activité de l'ATP citrate lyase (ACL), conduisant à une augmentation de la production d'acétyl-coA et par conséquent, de la synthèse d'acides gras (AG), et enfin, une augmentation de l'activité de HIF-1 α , quelles que soient les conditions d'oxygénation⁶³.

De plus, la glutamine est impliquée dans la synthèse du glutathion (GSH), *via* l'association de trois acides aminés qui sont le glutamate, la cystéine et la glycine. Le GSH est fortement impliqué dans les dérégulations métaboliques survenant dans les cancers ; il joue notamment un rôle très important dans la progression du cancer, en induisant la prolifération et la survie des cellules cancéreuses. Son implication est cruciale dans l'induction de la résistance des cellules cancéreuses aux différentes molécules utilisées pour traiter les cancers, en se liant à ces drogues, ainsi qu'en régulant l'équilibre oxydatif par son interaction avec les ROS, et en participant aux processus de réparation de l'ADN⁶⁴. La glutaminolyse fait donc partie intégrante des mécanismes de survie développés par les cellules cancéreuses.

2.1.5. Le métabolisme des lipides

Les AG sont essentiels à la prolifération des cellules cancéreuses. Ils sont nécessaires pour la synthèse des membranes cellulaires, dans la production et le

stockage d'énergie, ainsi que dans la signalisation cellulaire⁴⁸. C'est pourquoi leur synthèse est régulée positivement dans les cancers⁶⁵. La FASN (Fatty Acid Synthase) facilite la synthèse des AG. C'est une enzyme métabolique clé qui catalyse l'étape finale de la synthèse des AG. Sa surexpression et son hyperactivité dans les cancers procurent un avantage de croissance et de survie pour les cellules cancéreuses. Cette enzyme peut donc fonctionner comme un intermédiaire métabolique de l'oncogenèse. Sa régulation est précoce dans les tumeurs, en réponse aux lésions pré-invasives du microenvironnement tumoral, tels que l'hypoxie, l'acidité élevée du milieu extracellulaire et le manque de nutriments. L'expression de la FASN est affectée par certains composants, notamment des facteurs de croissance *via* les voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et MAPK.

Les cellules cancéreuses utilisent la lipogenèse *de novo* pour produire les AG nécessaires à leur prolifération. Cette biogenèse est exacerbée dans les tumeurs, quel que soit le taux de lipides circulants⁶⁶. Cette voie débute avec l'acétyl-coA, produit par l'ACL pour donner du malonyl-coA *via* l'Acétyl-coA Carboxylase qui est elle-même régulée par la voie des MAPK⁶⁷. L'ACL est fortement surexprimée dans les cancers, et son niveau d'expression est corrélé avec le stade de différenciation tumoral, ainsi qu'à un pronostic plutôt défavorable⁶⁵. En présence d'une quantité suffisante d'oxygène et de nutriments dans le microenvironnement, les cellules cancéreuses synthétisent plus d'AG *de novo*. En conditions d'hypoxie, la production d'acétyl-coA provenant de la glycolyse est supprimée, *via* la stimulation de l'expression de PDK-1 qui se phosphoryle et inhibe le PDC. Cela nuit aux cellules qui ne peuvent donc plus produire d'acétyl-coA *via* la glycolyse, et rend alors la glutamine principale source d'acétyl-coA pour la synthèse des AG⁴⁸.

Cependant, en conditions de stress métabolique, en plus de l'augmentation de la lipogenèse, les cellules tumorales peuvent acquérir des AG *via* la lipolyse pour supporter leur croissance. Elles auront également tendance à récupérer les lipides extracellulaires pour permettre de maintenir leur prolifération et leur survie, ce qui est considéré comme un important mécanisme d'adaptation^{68,69}. Cette lipolyse est médiée par une enzyme clé : la Lipoprotéine Lipase (LPL). Il se trouve qu'une activité élevée de cette enzyme a été décrite dans les cancers du poumon, et la LPL a été identifiée comme un marqueur de mauvais pronostic dans les leucémies lymphoïdes chroniques⁷⁰.

Les lipides cellulaires en excès (AG libres et cholestérol) sont estérifiés en triacylglycérol (TAG) et cholestéryl esters (CE), et sont ensuite stockés dans les gouttelettes lipidiques par les cellules⁶⁹. La dégradation de ces lipides de stockage survient lorsque les demandes en énergie augmentent, en réponse à un stress métabolique. Les cellules cancéreuses étant caractérisées par une augmentation de la synthèse et de la consommation d'AG, ceci induit une accumulation de gouttelettes lipidiques. De récentes études ont montré que l'abondance de ces gouttelettes était liée à une augmentation de l'agressivité des cancers ainsi qu'à une chimiorésistance ; favorisant ainsi la prolifération cellulaire cancéreuse⁷⁰. De plus, l'oxydation des AG (FAO pour Fatty Acid Oxydation) est requise pour la survie des cellules dans certains cancers. Cette oxydation augmente lorsque les besoins en énergie de la cellule augmentent (production d'ATP). Cette FAO repose sur une enzyme mitochondriale, la CPT1 (Carnitine Palmitoyltransférase 1), qui entraîne la production d'acétyl-coA qui va à nouveau entrer dans le cycle de Krebs et relancer un cycle de production de nouveaux lipides⁷¹. Les taux élevés de CPT sont associés à l'agressivité du cancer⁶⁵. Son expression dans les cellules cancéreuses favorise la

production d'ATP *via* la FAO, la croissance tumorale et l'échappement au stress métabolique. Enfin, la production de NADPH dérivée de la FAO par les cellules cancéreuses est essentielle pour leur permettre de lutter contre le stress oxydatif. La disponibilité de NADPH est contrôlée par l'axe *LKB1/AMPK* (Liver Kinase B1). Bien que l'axe *LKB1/AMPK* soit considéré comme suppresseur de tumeur, l'activité *AMPK* est essentielle pour qu'une cellule cancéreuse détecte les *stimuli* stressogènes et réagisse en activant un commutateur catabolique qui augmente les réserves d'ATP et de NADPH⁶⁷.

2.1.6. Le métabolisme des phospholipides

Les phospholipides, les glycolipides et le cholestérol sont des composants majeurs des membranes cellulaires. Le métabolisme de la choline a été décrit comme fortement altéré dans plusieurs types de cancers. Plus précisément, les Choline Kinases (CK), enzymes de dégradation de la choline en phosphocholine (PC) sont surexprimées, ce qui entraîne une augmentation des niveaux de PC, qui joue un rôle important dans la prolifération cellulaire cancéreuse⁷². Cependant, seule la CK alpha (CK α) joue un rôle central dans le maintien de la biosynthèse de PC requise pour la croissance incontrôlée de cellules cancéreuses. En plus de sa fonction métabolique, il a été prouvé que cette enzyme joue un rôle essentiel dans l'oncogenèse, la progression tumorale et les métastases dans plusieurs cancers nécessaires à l'activation des voies de signalisation déclenchées par le facteur de croissance (activation de *RAS*, signalisation *PI3K/AKT*)⁷³. De plus, l'augmentation de l'activité des transporteurs de la choline conduit à une absorption facilitée de celle-ci, qui est aussi renforcée par sa phosphorylation rapide par les CK, dont l'activité est

augmentée dans les cancers. Cela contribue à l'accumulation de la PC dans les cellules cancéreuses. On retrouve également une augmentation de PC dans les cellules hypoxiques, liée à l'induction des CK par HIF-1. Le microenvironnement tumoral joue aussi un rôle important, en affectant l'absorption et la phosphorylation de la choline, conférant un avantage de survie aux cellules hypoxiques. La PC est considérée comme un métabolite oncogène soluble, doté de propriétés stimulant la croissance cellulaire⁷⁴.

D'autre part, le métabolisme de l'éthanolamine est décrit comme étant dérégulé dans les cancers, de façon similaire à celui de la choline. Des niveaux élevés de phosphoéthanolamine (PE) indiquent une prolifération cellulaire intense, souvent observée dans les cancers, accompagnée d'une augmentation de PC. Ceci est dû à la régulation négative d'une enzyme, la phosphoéthanolamine citidylyltransferase, qui conduit à une signalisation et des fonctions membranaires perturbées, fréquemment décrites dans les cancers⁷⁵. Enfin, l'activation de mTORC1 induit une augmentation de l'activité de la lipine 1 et de la production de diacylglycérol, favorisant la synthèse de PC et de PE⁷⁴. Une étude a reporté un lien entre le potentiel métastatique dans les cancers et les niveaux élevés de plusieurs phospholipides, et notamment la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine, le phosphatidylinositol et la phosphatidylsérine⁷⁶.

2.2. Dans les LAM

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

Les ROS sont les produits du métabolisme de l'oxygène moléculaire par les cellules. Ils incluent l'anion superoxyde O_2^- , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , les radicaux hydroxyls et le monoxyde d'azote NO. Ils peuvent être générés par le système de transport des électrons dans la mitochondrie et par les complexes NADPH Oxydase au niveau des membranes (NOX)⁷⁷. Au sein de la niche hématopoïétique, les ROS sont des médiateurs chimiques de l'hématopoïèse normale qui participent au processus de contrôle de l'équilibre différenciation/autorenouvellement des CSH. Une augmentation des ROS peut conduire à des changements dans le phénotype des CSH et favorise leur différenciation vers les progéniteurs⁷⁸. L'hypoxie permet de réguler les NOX, ce qui préserve un taux de ROS bas et contribue à protéger les CSH contre le stress des ROS⁷⁹ et les maintient en quiescence. Le taux de ROS dans les CSH quiescentes est également médié par FoxO (forkhead O)⁸⁰.

Les cellules leucémiques, tout comme les CSH, produisent des ROS *via* les mitochondries ou les NOX. Toutefois, le rôle des ROS dans l'hématopoïèse leucémique reste ambigu. D'une part, Les ROS produits peuvent favoriser la prolifération des blastes⁸¹. Les taux de radicaux oxygénés sont plus élevés dans les cellules malignes, tels que les blastes dans les LAM, comparés aux leucocytes normaux. L'augmentation des niveaux basaux de ROS participent également à la transformation des cellules saines en cellules malignes. Les ROS participent aux dommages à l'ADN induits par différentes mutations, comme celles de l'ADN mitochondrial qui apparaissent souvent dans les tumeurs. Les mutations *FLT3*-ITD créent une instabilité génétique où les ROS entraînent des cassures doubles brins

ainsi que des erreurs de la réparation de l'ADN. Les ROS modulent aussi l'expression de protéines kinases, de facteurs de transcription et de leurs gènes associés, suggérant leur implication dans la leucémogénèse⁸² via la dérégulation de ces voies.

AKT et *FLT3* sont activés de manière constitutive dans la majorité des LAM, ce qui suggère une inhibition de la fonction de FoxO et une augmentation des niveaux de ROS par rapport aux CSH normales⁸³, ainsi qu'une régulation de la survie des cellules leucémiques, associée à une résistance à la chimiothérapie⁸⁴. En effet, il semble que l'agressivité et le mauvais pronostic associés aux LAM mutées *FLT3*-ITD sont dus à l'augmentation des ROS endogènes, qui sont produits par la signalisation du facteur de transcription STAT5 et l'activation de RAC1, qui est un composant essentiel des NOX productrices de ROS⁸⁵.

Les blastes peuvent avoir une activité de phosphorylation oxydative très élevée, qui est associée à une chimiorésistance. Les cellules leucémiques chimiorésistantes ont des taux élevés de ROS et une masse mitochondriale haute⁴¹, ce qui semble être lié à un transfert d'organelle de la moelle osseuse vers les blastes, qui nécessite l'activité de NOX2 qui va stimuler la libération des mitochondries par les cellules stromales⁸⁶. A l'inverse, les chimiothérapies induisant des ROS participent à éradiquer sélectivement les cellules souches leucémiques. Ainsi des variations interindividuelles (SNP – Single Nucleotide Polymorphism) de la NADPH oxydase, enzyme clé de l'émission de ROS, semblent modifier son activité et influencer l'efficacité des schémas d'induction dans les LAM. Enfin, notre équipe a montré récemment que les patients atteints de LAM avaient un équilibre redox dérégulé lié à leur statut moléculaire, impliquant les cellules leucémiques, les cellules non

tumorales et le système antioxydant, qui jouent un rôle majeur dans le pronostic des patients⁸⁷.

2.2.2. Les dérégulations de l'isocitrate déshydrogénase

Un exemple très significatif du rôle oncogénique des régulations métaboliques est celui des mutations somatiques affectant le gène de l'isocitrate déshydrogénase (IDH) dans environ 15 à 20% des LAM⁸⁸.

L'enzyme IDH existe sous plusieurs isoformes. IDH1 est la forme cytoplasmique. Elle favorise l'activité de plusieurs dioxygénases qui ont besoin de l' α -KG en tant que co-substrat, la génération de NADPH et la carboxylation de l' α -KG en isocitrate, qui lui-même favorise la génération de lipides après conversion en acétyl-coA. IDH2 est la forme mitochondriale ; elle régule la concentration d' α -KG et d'isocitrate dans la mitochondrie en utilisant le NAD⁺ pour oxyder l'isocitrate en α -KG dans le cycle de Krebs⁸⁹. Enfin, il existe une troisième forme, IDH3, qui est NAD⁺ dépendante et qui favorise la production d' α -KG requis pour la génération de succinate puis d'ATP⁹⁰.

Dans les LAM, les deux isoformes IDH1 et IDH2 peuvent être mutées. Elles entraînent toutes les deux des niveaux élevés de 2-HG dans les cellules tumorales, critiques pour la prolifération cancéreuse⁹¹. Il faut préciser que la mutation n'entraîne pas de modification de la concentration d' α -KG dans le sérum, ni des autres intermédiaires du cycle de Krebs tels que le succinate, le malate ou le fumarate. Il n'a pas été observé de différences de concentrations de ces métabolites entre des échantillons de patients mutés et non mutés pour *IDH*. De plus, le 2-HG est le seul produit de la réaction de transformation de l' α -KG par IDH⁹². Ces informations sont

cohérentes avec celles décrites dans les gliomes, très bien connus également pour leur mutation de l'isocitrate déshydrogénase⁹³. De façon intéressante, l'importance de la dérégulation métabolique objectivée par la mesure de la quantité d'oncométabolite produit par les cellules tumorales est corrélée au pronostic de la maladie.

L'enzyme IDH est impliquée dans plusieurs processus. Elle joue un rôle crucial dans la modification du métabolisme énergétique de la cellule leucémique, conduisant à la consommation de NADPH, qui est critique pour plusieurs processus métaboliques dans les cellules, et notamment la synthèse de GSH⁹³. D'autre part, plusieurs mécanismes sont mis en place par les cellules tumorales pour adapter leur métabolisme à l'hypoxie environnante, *via* l'activation continue de HIF-1, qui survient même sous des conditions normales d'oxygénation. Parmi ces mécanismes, on retrouve l'hyperactivation de mTORC1 ou encore l'accumulation de ROS⁴⁸. Enfin, l'inhibition de l'enzyme TET2 suite à la production de 2-HG par les cellules mutées entraînent la méthylation des histones ainsi qu'une hyperméthylation de l'ADN⁵⁸.

2.2.3. Les dérégulations du métabolisme du glucose

Dans les LAM, une consommation très intense de glucose et une très forte absorption de ce métabolite dans la moelle osseuse ont été largement décrites. Les cellules leucémiques peuvent compenser des niveaux trop faibles en glucose en régulant positivement le gène *SLC2A5*, qui code pour GLUT5 (qui est un transporteur du fructose). Les cas de LAM présentant des niveaux élevés de GLUT5 sont associés à un mauvais pronostic. De plus, il a été montré que les cellules

leucémiques induisent des manipulations complexes de l'homéostasie métabolique de l'hôte, afin de garantir des concentrations en glucose élevées dans la moelle osseuse. Ceci implique notamment de provoquer une augmentation de l'insulinorésistance et une inhibition de la sécrétion d'insuline par les tissus⁹⁴.

La signalisation de mTOR qui est fréquemment activée dans les LAM joue un rôle important dans les dérégulations de la glycolyse. La sérine/thréonine kinase mTORC1 est suractivée dans les LAM, ce qui favorise la glycolyse, et l'addiction des cellules au glucose. L'inhibition de cette voie de signalisation dans les LAM engendre une reprogrammation métabolique, impliquant notamment la G6PD (Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase), qui constitue une source importante de NADPH et qui intervient dans le maintien du métabolisme énergétiques des cellules leucémiques⁹⁰. Par ailleurs, la surexpression de G6PD est fortement corrélée à un pronostic défavorable chez les patients atteints de LAM⁹⁵. De même, la voie des pentoses phosphates est une voie importante de survie des cellules cancéreuses dans les LAM, et elle dépend fortement de l'activité de mTORC1. D'ailleurs, les gènes de cette voie sont fortement uprégulés dans plus de 60% des cas de LAM⁸⁹.

D'autre part, la MAP kinase, qui est également une sérine/thréonine kinase, favorise l'utilisation du glucose et la glycolyse par les cellules leucémiques. Sa délétion engendre une inhibition de la leucémogénèse et des cellules souches leucémiques en réduisant l'expression de GLUT1. Ceci conduit à diminuer le flux de glucose et à induire un stress oxydatif dans le microenvironnement médullaire hypoglycémique⁹⁶.

Une signature du métabolisme du glucose a été décrite dans les LAM. En effet, un panel de six métabolites impliqués dans la glycolyse (glycérol-3-phosphate, pyruvate, lactate) et dans le cycle de Krebs (citrate, α -KG, 2-HG) ont été identifiés comme ayant une valeur pronostique dans les LAM à caryotype normal, entraînant

préférentiellement un pronostic plus défavorable, qui se traduit notamment par une diminution de la sensibilité au traitement par aracytine⁹⁷. Enfin, des taux élevés de LDH sériques au diagnostic sont des marqueurs pronostiques fortement négatifs dans les LAM⁸⁹.

2.2.4. Les dérégulations du métabolisme de la glutamine

Les cellules souches leucémiques ont une capacité d'absorption accrue des acides aminés, et en particulier de la glutamine. Elles en dépendent pour leur survie et leur prolifération⁹⁸. Ceci est reflété par le fait que les concentrations plasmatiques de glutamine chez les patients atteints de LAM sont beaucoup plus faibles que celles retrouvées chez des individus sains.

La glutamine est particulièrement impliquée dans la reprogrammation métabolique. Les cellules leucémiques utilisent la glutamine comme source de carbone pour la production d'énergie *via* le cycle de Krebs et l'homéostasie redox. Les cellules développent alors une addiction à la glutamine⁹⁹. Le niveau de glutamine dans la cellule leucémique contrôle la phosphorylation oxydative dans la mitochondrie. Beaucoup d'études ont montré que le fait de cibler la glutaminolyse dans les LAM représente donc une bonne stratégie pour développer de nouveaux agents thérapeutiques agissant sur cette voie. C'est le cas en particulier dans les LAM mutées *FLT3-ITD*, qui sont très dépendantes de la glutamine pour faire fonctionner le métabolisme énergétique^{98,100}. Le ciblage de l'absorption de la glutamine entraîne des réponses anti-leucémiques efficaces dans les LAM, qui pourraient être liées à l'implication de la voie mTORC1 en aval de cette dépendance des cellules à la

glutamine¹⁰¹. Cependant la GLS est retrouvée comme étant fortement exprimée dans les LAM, ce qui en fait un facteur limitant de l'activité du cycle de Krebs. L'équilibre entre la glutaminolyse et l'activité du cycle de Krebs apparaît donc comme essentiel dans la survie des cellules leucémiques⁸⁹. La glutamine est également un métabolite important pour la synthèse du GSH, et donc indirectement un élément essentiel du contrôle de l'équilibre redox dans les LAM.

2.2.5. Les dérégulations du métabolisme lipidique

L'absorption et la consommation d'AG impacte des aspects importants dans la biologie des LAM, en influençant les destins cellulaires des CSL, leur adaptation au microenvironnement et leur résistance aux drogues⁸⁹. La consommation d'AG est augmentée dans les LAM pour augmenter la synthèse des lipides par les cellules leucémiques⁹⁷ qui serait favorisée par mTOR¹⁰². L'implication des MAP kinases est également liée à ce phénomène, puisqu'elles favorisent l'oxydation des AG, et leur activation inhibe la biosynthèse des AG induite par mTORC1⁹⁰. Une étude récente a montré que les patients ayant une LAM rapidement progressive et qui ne répondaient pas au traitement présentaient des altérations du métabolisme lipidique comparés aux autres patients¹⁰³. Il a également été montré qu'une faible expression de l'ACL est associée à un pronostic favorable chez des patients atteints de LAM, et entraîne un arrêt de la croissance cellulaire lorsqu'elle est inhibée dans des modèles cellulaires leucémiques¹⁰⁴.

Dans les LAM, la FAO diminue le seuil d'apoptose et favorise la quiescence des cellules leucémiques. Plusieurs équipes ont testé différentes molécules afin d'inhiber

cette FAO. Parmi elles, l'etomoxir sensibilise les cellules leucémiques à l'apoptose et diminue le nombre de progéniteurs quiescents¹⁰⁵. Également, l'avocatine B, combinée à un agent de chimiothérapie standard (AraC) induit une apoptose des cellules de LAM et une inhibition de la croissance cellulaire¹⁰⁶. Enfin, Picou et al. ont testé l'impact des AG polyinsaturés sur des lignées cellulaires de LAM et sur des blastes de patients. Ce type d'AG induit ainsi une inhibition de la phosphorylation oxydative mitochondriale, une augmentation de la glycolyse et une augmentation du stress oxydatif, entraînant la mort des cellules cancéreuses¹⁰⁷.

D'autre part, CPT1A, une sous-unité de l'enzyme mitochondriale sur laquelle repose la FAO, a été retrouvée surexprimée dans des échantillons de moelle osseuse de patients atteints de LAM comparés à des moelles osseuses normales. Ceci est fortement associé à un pronostic défavorable¹⁰⁸. La FAO peut contribuer à un mécanisme favorisant la résistance aux thérapies. En effet, les cellules de LAM résistantes montrent une surexpression de CD36, un transporteur d'AG, à leur membrane, et une FAO très intense. Le NADPH dérivé de la FAO peut être un donneur d'électrons décisif pour les cellules leucémiques sous thérapie, qui leur permet ensuite de combattre le stress oxydatif, et qui peut servir aux processus anaboliques nécessaires à la division cellulaire^{41,89}. De plus, un nouvel élément, PHD3 (Prolyl Hydroxylase Domain 3), a été découvert comme pouvant être intéressant dans le métabolisme des LAM. Il fait partie d'une classe d'enzymes capables de coordonner le métabolisme en réponse à des conditions cellulaires changeantes. La fonction normale de PHD3 est de réprimer l'activité de FAO dans des conditions d'abondance nutritive dans le milieu cellulaire. Cependant, il a été montré que dans les LAM, cette enzyme est présente à un seuil beaucoup plus faible, ce qui entraîne une persistance de la FAO indépendamment des conditions

nutritives extérieures. Ceci pourrait faire de PHD3 un très bon biomarqueur des LAM¹⁰⁹.

Plusieurs modèles lipidiques représentatifs de différents types de LAM ont été identifiés récemment par spectrométrie de masse. En effet, des différences significatives concernant la modulation de la synthèse des céramides et des sphingolipides ont été mises en évidence chez les patients présentant une t(8 ;21) par rapport à ceux présentant une inv(16) ou un caryotype normal¹¹⁰. Également, Stuani et al. ont mis en lumière des dérégulations du métabolisme lipidique dans un modèle cellulaire de LAM muté pour le gène IDH1, par rapport à un modèle non muté. Ces différences sont principalement caractérisées par une augmentation de phosphatidylinositol, sphingolipides, cholestérol libre et AG monoinsaturés dans les cellules IDH mutées¹¹¹. Ceci met encore une fois en évidence l'impact des caractéristiques cytogénétiques et du statut mutationnel des patients atteints de LAM sur le métabolisme cellulaire. Enfin, une étude récente montre une diminution des AG totaux dans les plasmas de patients atteints de LAM ainsi qu'une atténuation des phosphocholine, triglycérides et cholestérol esters plasmatiques. De plus, l'acide arachidonique apparaît comme étant augmenté dans les plasmas de LAM, suggérant son implication dans le phénotype cancéreux¹¹².

2.2.6. Les dérégulations du métabolisme des phospholipides

Très peu d'informations sont disponibles concernant les liens potentiels entre les dérégulations de certains métabolites du métabolisme des phospholipides et la leucémogénèse. Une équipe a récemment fait un état des lieux du lipidome dans des

plasmas de patients atteints de LAM, et montre une diminution des AG totaux libres, dont la phosphocholine, qui serait probablement due à une oxydation accrue des AG dans les cellules de LAM. Ceci aurait un impact sur le pronostic, qui s'orienterait plutôt de manière défavorable¹¹³. Également, Wang *et al* ont montré des niveaux plus faibles de PC dans les sérums de patients atteints de LAM, probablement en lien avec les besoins excessifs de ce métabolite pour la prolifération des cellules leucémiques. De façon intéressante, ils ont également observé que ce métabolite était exprimé à un plus haut niveau dans les sérums de patients de pronostic intermédiaire par rapport aux patients de pronostic favorable. Ceci plaide en faveur d'un impact défavorable de la PC sur le pronostic¹¹⁴.

D'autre part, une diminution significative de phosphatidylsérine et sphingomyéline ont été décrite dans les cellules mononuclées sanguines de patients atteints de LAM par rapport à des donneurs sains¹¹⁵. Enfin, une étude beaucoup plus récente met en lumière l'implication d'une enzyme peu décrite encore dans les LAM : la Taffazine (TAZ). Cette enzyme catalyse la maturation de la cardiolipine, et est donc une enzyme clé pour la biosynthèse des phospholipides. Lorsque la TAZ est réprimée, cela entraîne une diminution de la prolifération cellulaire cancéreuse, une inhibition de la croissance clonogénique ainsi qu'une induction de la différenciation des cellules leucémiques, tout en préservant l'hématopoïèse normale. L'étude du profil phospholipidique des cellules de LAM lorsque TAZ est réprimée montre que, en plus d'une diminution attendue de la cardiolipine, on observe une diminution de la phosphatidyléthanolamine et une augmentation de la phosphatidylsérine. Cette étude propose un nouveau mécanisme pour cibler les CSL au niveau thérapeutique^{116,117}.

2.2.7. Les dérégulations des régulateurs du métabolisme : la voie LKB1/AMPK/mTOR

LKB1 est une sérine thréonine kinase codée par le gène *STK11* situé sur le chromosome 19p13.3 chez l'homme^{118,119}. Cette enzyme est impliquée dans la régulation du métabolisme cellulaire, tout en régissant également des processus importants tels que la prolifération cellulaire, la polarité et la migration, qui sont tous cruciaux dans la carcinogenèse¹²⁰. LKB1 a été identifié comme un suppresseur de tumeur lorsqu'il a été découvert que les mutations germinales survenant dans le gène codant pour LKB1 étaient responsables d'une maladie rare appelée syndrome de Peutz-Jeghers (SPJ), qui provoque une prédisposition au cancer¹²¹. Des mutations de LKB1 ou des pertes de chromosome 19p sont également impliquées dans les adénocarcinomes pulmonaires sporadiques¹²². De plus, des mutations somatiques de LKB1 se sont avérées agir en synergie avec les infections à papillomavirus humain et favoriser la progression de la maladie chez environ 20% des patients atteints d'un cancer du col de l'utérus¹²³. Des études récentes ont démontré que LKB1 pouvait jouer un rôle dans la conduite de la pathogenèse de plusieurs cancers hématologiques, y compris les LAM¹²⁴.

Des études antérieures ont permis d'identifier plusieurs effecteurs régulés par LKB1. Certains d'entre eux incluent des protéines importantes impliquées dans plusieurs cancers ou syndromes cancéreux comme p53¹²⁵ et le gène suppresseur de tumeur PTEN (Phosphatase and TENsin homolog)¹²⁶. L'une des cibles en aval les plus importantes de LKB1 est la protéine kinase AMP-dépendante (AMPK) qui a été identifiée en 2003. LKB1 phosphoryle l'AMPK au niveau de la thréonine 172 et l'active¹²⁷. Il a également été découvert que 14 autres kinases similaires à l'AMPK

sont activées par LKB1, mais parmi celles-ci, seuls l'AMPK $\alpha 1$ et $\alpha 2$ (composants catalytiques de l'AMPK) semblent être activés dans des conditions de faible teneur en nutriments par LKB1¹²⁸ ; ce qui implique le rôle de l'axe LKB1/AMPK dans la détection des niveaux d'énergie cellulaire. Par conséquent, la voie de signalisation LKB1/AMPK a été surnommée le « point de contrôle métabolique » responsable de l'inhibition de la croissance cellulaire dans un environnement pauvre en nutriments et ATP¹²⁰. La croissance cellulaire est arrêtée dans de telles conditions en raison de l'inhibition des processus anaboliques dus à la phosphorylation médiée par LKB1 et à l'activation subséquente de l'AMPK, qui supprime davantage l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase, mTORC1 et de la HMG-CoA-réductase¹²⁹. Dans l'ensemble, en conditions de privation d'énergie cellulaire et de stress, LKB1 est activée et le métabolisme passe, pour la plus grande partie, de l'anabolisme au catabolisme.

De façon intéressante dans les LAM, LKB1 s'est révélé être fortement exprimé dans la population de cellules souches leucémiques CD34⁺/CD38⁻. L'inhibition de l'activité de LKB1 dans ces cellules semblerait stopper leur prolifération et les rendre plus sensibles à la chimiothérapie. En étudiant les profils d'expression génique dans des cellules de lignée leucémique (KG1a) exprimant LKB1, il a été constaté que la voie des MAPK était active et pouvait être un effet en aval de la signalisation LKB1 indépendante d'AMPK¹³⁰. Par conséquent, contrairement à son rôle suppresseur de tumeur dans la plupart des cancers, LKB1 peut agir comme un facteur favorisant la tumeur dans les LAM, mais ce mécanisme n'a pas encore été étudié. D'autre part, la voie LKB1 dépendante d'AMPK, voie la mieux établie, est également impliquée dans les LAM. Cette voie fonctionne *via* l'inhibition de mTOR pour inhiber davantage la traduction des protéines et donc la prolifération cellulaire¹²⁴. De plus, un polymorphisme dans LKB1 en position 354 qui provoque un changement d'acides

aminés de la phénylalanine en leucine (Phe354Leu) dans le domaine C-terminal de la protéine, provoque également une diminution de l'activation AMPK médiée par LKB1¹³¹.

Un autre ensemble de kinases effectrices en aval activées par LKB1 sont les SIK2 et 3 (Salt-Inducible Kinase)¹³². Cet axe LKB1-SIK2/3 a été très récemment impliqué dans la progression de la LAM. Après l'activation de SIK2 et SIK3 suivant la phosphorylation médiée par LKB1, ces derniers favorisent le mouvement des histones désacétylases de classe IIa (HDAC) qui comprennent les HDAC 4, 5, 7 et 9¹³⁰. Parmi ceux-ci, HDAC4 est spécifiquement impliqué dans la progression de la LAM. De façon normale, lorsque HDAC4 est actif, il inhibe un facteur répressif appelé MEF2C (Myocyte Enhancer Factor 2C), qui s'est avéré être fortement surexprimé dans les leucémies^{124,131}. SIK2 et 3 phosphorylent HDAC4 et inhibent son activité de désacétylation. Par conséquent, HDAC4 ne peut pas inhiber MEF2C et il agit comme un facteur de transcription provoquant l'expression de gènes qui favorisent la prolifération des cellules de LAM. Ainsi, vu sous cet angle, LKB1 semble être pro-tumoral en ce qui concerne la LAM. Le traitement de ces cellules avec des inhibiteurs de SIK2/3 confère une sensibilité aux médicaments et tue ces cellules, donnant lieu à une valeur thérapeutique potentielle pour les inhibiteurs de SIK dans les cas positifs à LKB1-SIK¹³¹.

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

Au vu des données de la littérature concernant les dérégulations métaboliques observées dans les cancers et plus particulièrement dans les LAM, nous avons pu établir une cartographie des voies métaboliques caractérisées chez les patients atteints de LAM, entraînant des dérégulations du cycle de Krebs, de la glycolyse, du métabolisme de la glutamine/du glutamate, du métabolisme des phospholipides et du métabolisme des acides aminés (**Figure 10**).

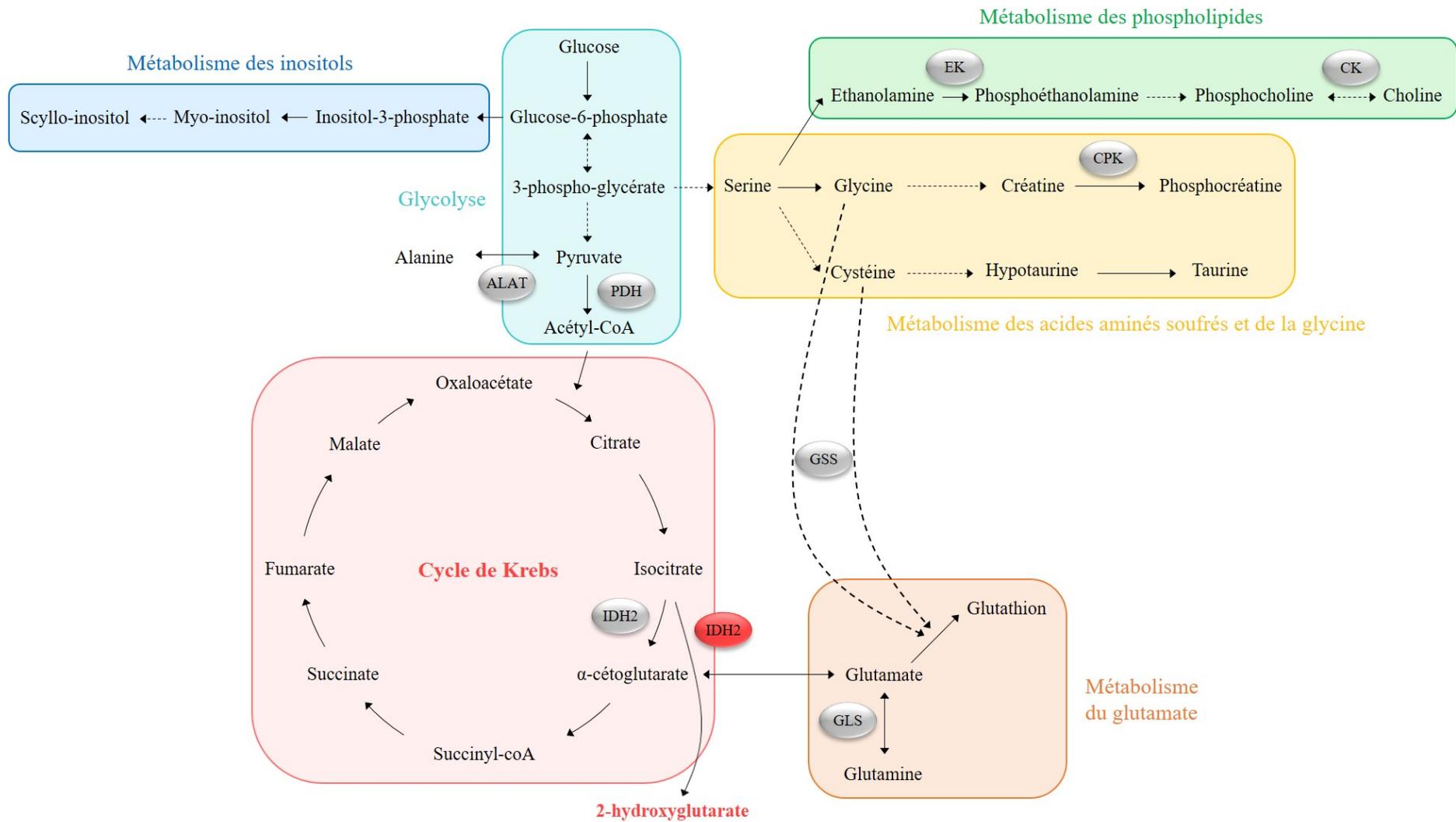


Figure 10. Cartographie des voies métaboliques fonctionnelles dérégulées dans les LAM

3. L'étude du métabolisme par une approche métabolomique

3.1. Contexte

Malgré les progrès considérables dans la compréhension des bases moléculaires des LAM, nous avons besoin d'aller plus loin dans la caractérisation des cellules leucémiques pour mieux définir le pronostic des patients au diagnostic et pour développer des nouvelles stratégies thérapeutiques adaptées à chaque patient. Dans un contexte de métabolisme dérégulé chez les cellules leucémiques, nous avons utilisé une approche métabolomique non ciblée dans le but de rechercher des métabolites pouvant apporter des informations sur le pronostic et permettre de mieux cibler les traitements. Cette approche a été utilisée dans des modèles cellulaires de LAM, ainsi que dans les LAM *de novo* de l'adulte, au moment du diagnostic. Pour étudier ces changements métaboliques, nous avons fait une étude sur cinq lignées cellulaires leucémiques, très différentes au niveau cytologique et génétique, dans différentes conditions de culture. En parallèle, nous avons effectué une étude prospective chez des patients atteints de LAM, à partir de prélèvements de moelle osseuse avant induction de chimiothérapie.

3.2. La métabolomique

La métabolomique est l'exploration du métabolome, c'est à dire l'ensemble de tous les métabolites, détectables dans un échantillon biologique, produits finaux de son expression génique. Les métabolites sont un ensemble hétérogène, constitué de

toutes les molécules ayant un poids moléculaire inférieur à 1000 Daltons¹³³. Ceci inclut spécifiquement les peptides, oligonucléotides, acides organiques, acides aminés, lipides et xénobiotiques. Ainsi, la métabolomique donne un aperçu instantané de toutes les cascades des événements moléculaires dans les cellules, appelé « empreinte métabolique » ou « profil métabolique »¹³⁴. Cette approche innovante est très puissante pour la classification et le diagnostic et pour la découverte de biomarqueurs¹³⁵. Elle a été utilisée pour la caractérisation de phénotypes métaboliques (métabotypes) d'une variété de cancers comme les cancers du cerveau, de la prostate ou du foie¹³⁶.

3.3. Méthodes d'analyse

Deux méthodes sont essentiellement utilisées dans l'analyse haute résolution du métabolome : la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et la Spectrométrie de Masse (MS)¹³⁷. Nous avons décidé d'utiliser la RMN du proton (¹H) qui est la technique la plus rapide (quelques minutes d'acquisition) et la plus facile à mettre en œuvre. De plus, cette méthode est non destructive, très reproductible et permet de faire une analyse quantitative des métabolites retrouvés dans les échantillons¹³³. Il existe néanmoins quelques limites à cette technique, notamment le fait qu'elle est beaucoup moins sensible que la MS. La RMN ne demande que très peu de préparation d'échantillon, la seule contrainte étant l'ajout de solvants deutérés dans les échantillons. Nous avons couplé cette technique à une méthode HRMAS (High Resolution Magic Angle Spinning), qui permet d'analyser directement les échantillons sans étape préalable d'extraction chimique des métabolites¹³⁸, tout en conservant une haute résolution spectrale. Cette méthode est particulièrement adaptée à

l'analyse d'échantillons semi-solides tels que les cellules de patients, et elle nous permet d'être très proche des conditions *in vivo*.

3.4. La métabolomique basée sur la RMN-HRMAS

La RMN est une méthode biophysique non destructive qui sonde la matière au niveau atomique, permettant l'extraction d'informations structurales : elle décrit comment les atomes sont liés entre eux, avec ou sans liaisons covalentes. La RMN est basée sur la mécanique quantique, dont nous allons présenter ici les principes basiques pour comprendre la métabolomique. La RMN est basée sur l'interaction de deux champs magnétiques avec la matière. Certains noyaux atomiques ont une propriété spécifique : le spin nucléaire. C'est le cas du proton ^1H , du phosphore ^{31}P et du carbone ^{13}C , tandis que le carbone ^{12}C n'a pas de spin nucléaire. A ce spin nucléaire est associé un moment magnétique, qui peut être comparé à un petit aimant. Sans champ magnétique, les spins nucléaires sont dispersés de façon isotrope dans l'espace. Lors de l'application d'un champ magnétique externe intense (appelé usuellement B_0), les spins s'alignent de façon parallèle ou antiparallèle à ce champ. Il en résulte une nette magnétisation macroscopique M_0 , alignée parallèlement à B_0 : c'est la position d'équilibre (**Figure 11A**). Avec l'application d'un second champ magnétique, de plus faible intensité (appelé B_1), appliqué perpendiculairement au premier champ, les spins sont excités ; c'est à dire que la magnétisation est déplacée de sa position d'équilibre (**Figure 11B**). Quand l'excitation est stoppée – elle dure quelques microsecondes –, les spins retournent à leur état d'équilibre : c'est la relaxation. Grâce à une bobine, nous pouvons détecter le signal électromagnétique émis par les spins pendant la relaxation. Le signal est

amplifié et transmis au système informatique et la transformée de Fourier est appliquée pour convertir le signal de temps – appelé FID pour Free Induction Decay – en domaine de fréquence, c'est à dire pour obtenir un spectre (**Figure 11C**)¹³⁹.

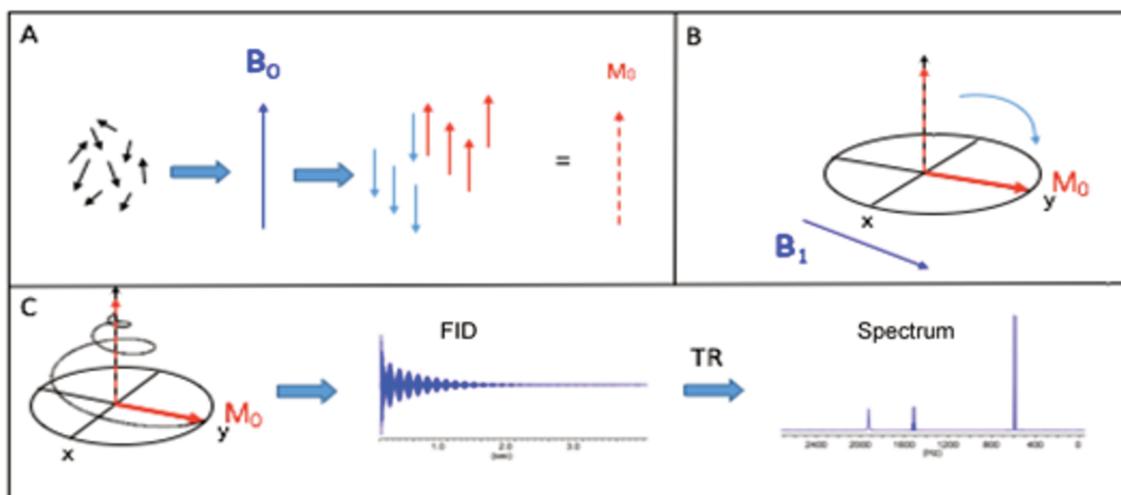


Figure 11. **A.** Principe d'une expérience RMN. Alignement des spins nucléaires dans le champ magnétique B_0 . **B.** Application du champ magnétique B_1 perpendiculaire à B_0 : perturbation de l'équilibre. **C.** Retour à l'équilibre, signal de temps et spectre.

La RMN haute résolution est la RMN des échantillons liquides. Les échantillons non liquides ou hétérogènes, comme les cellules et les biopsies (**Figure 12A**), donnent des spectres de mauvaise résolution en RMN du proton, puisque certaines interactions magnétiques entre les spins ne sont pas moyennées par le mouvement des molécules, comme dans les liquides homogènes. Ceci crée de larges pics qui ne sont pas adaptés pour la métabolomique (**Figure 12B**). Une solution est d'extraire les métabolites des échantillons en utilisant des solvants organiques. Une autre alternative est l'utilisation d'une méthode récente : la RMN-HRMAS, dédiée aux échantillons non liquides, et qui permet d'obtenir des spectres de haute résolution sans extraire les métabolites, et donc d'éviter cette longue étape. Dans cette

méthode, l'échantillon est incliné d'un angle de $54,7^\circ$ – que l'on appelle « l'angle magique » –, relatif à B_0 (**Figure 12C**) et il tourne à haute vitesse (autour de 4 KHz). Il en résulte l'annulation des interactions responsables de l'élargissement, restituant la résolution (**Figure 12D**). Ainsi, les petits échantillons tels que les biopsies (≤ 15 mg), les cellules, les organelles ou les petits organismes peuvent être analysés directement dans des petits inserts (**Figure 12E**), sans aucune préparation¹³⁸. Pour attribuer proprement les métabolites aux pics, nous pouvons utiliser HMDB (Human Metabolome Database ; <http://www.hmdb.ca/>), qui est une base de données qui référence les métabolites.

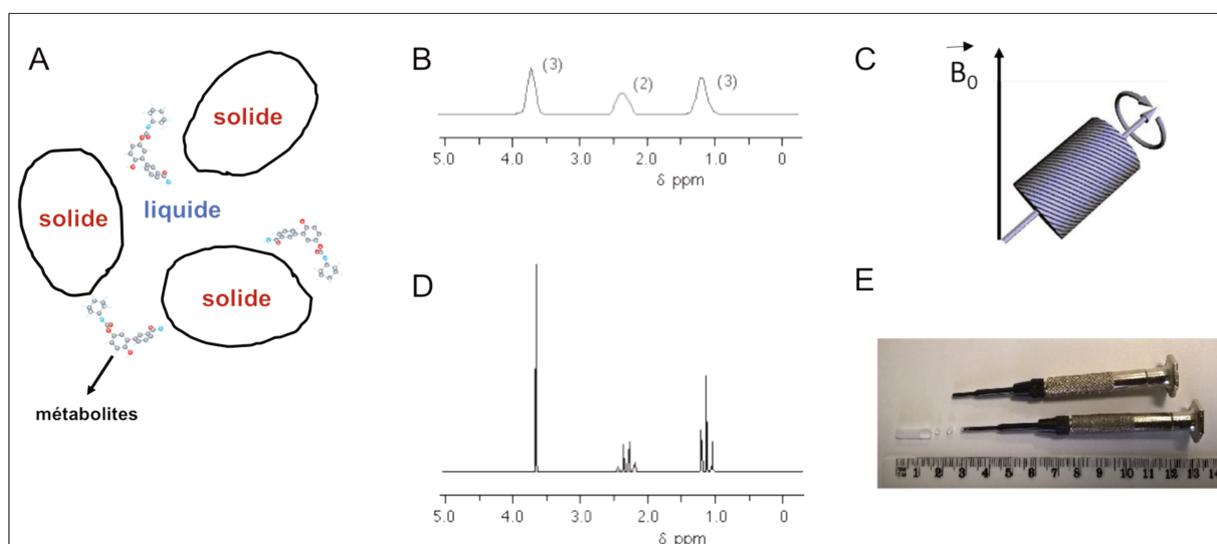


Figure 12. Méthode de RMN-HRMAS.

3.5. Principe général d'un protocole de métabolomique

Un protocole pour une étude métabolomique inclut plusieurs étapes : i) l'expérimentation, avec un design adapté à la question que l'on veut étudier en métabolomique ; ii) l'échantillonnage, avec le choix du type d'échantillon le plus

pertinent pour la question posée ; iii) la collecte des données, c'est à dire l'analyse des échantillons ; iv) le traitement des données, avec des étapes de pré-traitement (alignement, normalisation) et de traitement (statistiques multivariées) différentes ; et v) l'interprétation des données et le retour à la question biologique (**Figure 13**).

Toutes ces étapes doivent être réalisées de façon très reproductible, afin de limiter la variabilité expérimentale pour pouvoir observer l'effet étudié. Pour passer du métabolisme à la métabolomique, c'est à dire pour passer d'une approche séquentielle classique à une nouvelle approche globale, où tous les métabolites sont intégrés simultanément, des outils statistiques spécifiques sont nécessaires. Pour cela, des analyses statistiques multivariées comme l'Analyse en Composantes Principales (ACP) et l'Orthogonal Projection to Latent Structure-Discriminant Analysis (OPLS-DA) sont principalement utilisées pour identifier des clusters dans les échantillons et pour souligner les métabolites les plus importants servant à discriminer deux populations. C'est l'utilisation combinée de méthodes analytiques de pointe et d'outils statistiques avancés et dédiés qui a ouvert le champ à la métabolomique dans de nombreux domaines de recherche biomédicale ces dernières années, sans que de consensus ne soit encore trouvé actuellement pour standardiser les méthodes.

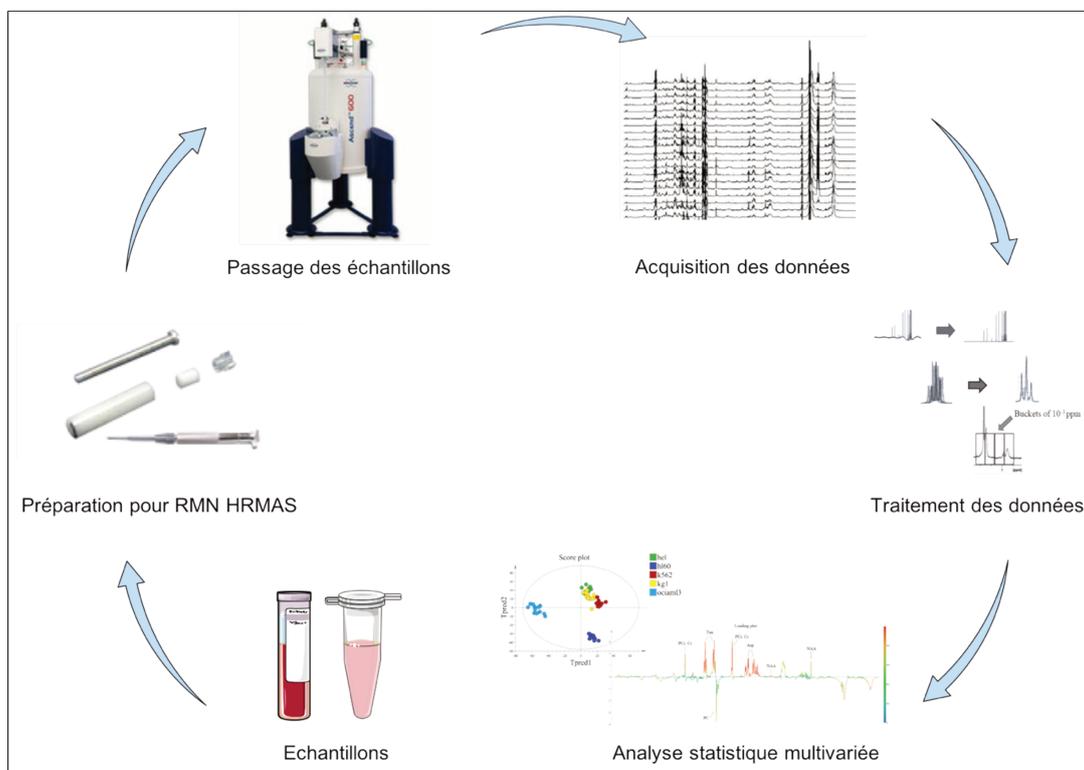


Figure 13. Principe général d'un protocole de métabolomique.

3.6. Traitement des données collectées

Le but d'une étude métabolomique est de mettre en évidence des profils métaboliques, ou une empreinte métabolique, qui est caractéristique d'un état donné, comparé à un autre état (pathologique *versus* contrôle sain par exemple). Les métabolites sont affectés d'un poids différent dans les modèles statistiques utilisées (OPLS-DA par exemple) ; les métabolites ayant le plus grand poids étant les plus discriminants pour une comparaison donnée. Ces métabolites sont les biomarqueurs recherchés. Pour cela, la stratégie est d'utiliser des méthodes de projection avec compression, qui permettent de représenter les individus dans un espace à 2 ou 3 dimensions.

L'ACP est une des méthodes utilisées, déjà bien connue. Cette méthode est basée sur la construction de composantes principales, combinaisons linéaires des variables initiales, qui permet d'expliquer la variance du système en perdant le minimum d'information. Le nombre de composantes principales est largement plus petit que le nombre de métabolites initiaux. Les scores des échantillons sont représentés dans un plan relatif aux deux premières composantes – c'est le « Score plot » –, dans un but descriptif : cela permet de vérifier la qualité des données, trouver des clusters ou détecter des « outliers ». C'est une méthode non supervisée, c'est à dire qu'aucune connaissance *a priori* n'est requise. Dans un second temps, les analyses supervisées peuvent être utilisées, comme l'OPLS-DA, en étiquetant chaque échantillon par son groupe d'appartenance. La méthode, comme pour l'ACP, conduit à des composantes principales, mais qui sont construites cette fois pour maximiser la variance intergroupe et minimiser la variance intragroupe. Cette méthode est bien adaptée pour la classification et la prédiction. Le score plot est tracé, comme dans l'ACP, par rapport aux premières composantes. Simultanément, le graphique des variables expliquant les clusters d'individus – appelé le « Loading plot » –, est représenté dans un plan dans le but de trouver les métabolites les plus discriminants. Une représentation spécifique est construite pour les données provenant de la RMN, appelée « S-line » dans le logiciel SIMCA®. La S-line est un loading plot à une dimension. Le sens de variation des métabolites est directement observable sur la S-line, avec en positif les métabolites up-régulés et en négatif les métabolites down-régulés dans le groupe pathologique par rapport au groupe contrôle par exemple. De plus, les « pics » du loading plot sont colorés en fonction de leur corrélation avec l'appartenance au groupe.

4. L'étude du métabolisme par une approche lipidomique

4.1. Contexte

Le métabolisme des lipides et des phospholipides est décrit comme particulièrement dérégulé dans les LAM, et est fortement en interaction avec le microenvironnement. Suite à un certain nombre de résultats préliminaires obtenus en RMN-HRMAS, nous avons décidé d'approfondir cette voie métabolique en particulier pour mieux comprendre les dysfonctionnements survenant dans cette pathologie et essayer de déterminer les mécanismes sous-jacents. Nous avons utilisé une approche lipidomique non ciblée sur les mêmes lignées cellulaires que nous avons utilisées en métabolomique, ainsi que sur les plasmas médullaires des mêmes patients atteints de LAM *de novo* au diagnostic, avant toute induction de chimiothérapie. Cette approche nous a permis de définir des profils lipidomiques caractéristiques des modèles cellulaires de LAM et des patients atteints de cette pathologie.

4.2. La lipidomique

Un sous-ensemble du métabolome, nommé le lipidome, est destiné à cartographier tous les lipides présents dans une cellule, c'est ce qu'on appelle la lipidomique. Le but est de définir et de quantifier toutes les espèces lipidiques à l'intérieur d'une cellule. L'initiative LIPID MAPS®, conjointement avec le Comité International pour la Classification et la Nomenclature des Lipides (ICCNL), ont défini 8 catégories de lipides – composées de nombreuses classes et sous-classes – pour permettre de

décrire les espèces lipidiques présentes dans un échantillon biologique¹⁴⁰. Ces 8 catégories ont été établies en 2005, puis mises à jour en 2009¹⁴¹. Ainsi, les différentes catégories sont présentées dans le tableau ci-dessous (**Tableau V**).

Category	Abbreviation	Structures in Database
Fatty acyls	FA	2678
Glycerolipids	GL	3009
Glycerophospholipids	GP	1970
Sphingolipids	SP	620
Sterol Lipids	ST	1744
Prenol Lipids	PR	610
Saccharolipids	SL	11
Polyketides	PK	132

Tableau V. Catégories de lipides du système de classification et nombre de structures présentes dans la base de données LIPID MAPS®. D'après Fahy *et al*, Journal of Lipid Research, 2009.

4.3. Méthodes d'analyse

Deux techniques se démarquent pour analyser le lipidome. D'une part, le consortium LIPID MAPS® a développé des protocoles d'extraction optimisés pour chaque catégorie de lipides, conduisant ensuite à utiliser la chromatographie liquide (LC) pour séparer de manière optimale les espèces moléculaires spécifiques des lipides présents. L'éluat est ensuite couplé directement à un spectromètre de masse pour une analyse plus approfondie, telle que la fragmentation moléculaire (MSMS), la surveillance des réactions multiples (MRM) et le balayage d'ions à précurseurs multiples (MPIS)¹⁴⁰. D'autre part, la séparation et la quantification des AG peut aussi

être effectuée grâce à la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). C'est cette deuxième méthode, fiable et sensible, que nous avons utilisé pour notre analyse complète des AG libres et de la composition en AG des espèces retrouvées dans nos échantillons biologiques. La GC est largement décrite comme un outil fiable pour l'analyse de mélanges lipidiques complexes, tels ceux qui sont retrouvés dans les échantillons biologiques de patients atteints de cancer. De plus, la GC-MS est dorénavant une procédure de routine avec une large application à la recherche biomédicale¹⁴².

4.4. La lipidomique basée sur la GC-MS

La GC-MS est une technique d'analyse qui permet d'une part la séparation des composés d'un échantillon – *via* la chromatographie en phase gazeuse – et d'autre part la détection et l'identification des composés séparés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) – *via* la spectrométrie de masse. Les échantillons analysés par GC-MS peuvent être solides (ce qui nécessite au préalable d'extraire chimiquement les composés de l'échantillon), liquide ou gazeux. Pour pouvoir être analysés, les échantillons doivent être volatiles. Pour cela, il est nécessaire de chauffer l'échantillon à haute température pour qu'il puisse être vaporisé dans l'automate. Le principal avantage de la GC-MS est que l'appareil possède des échantillonneurs automatiques, qui sont utilisés pour garantir que la même quantité d'échantillon soit injectée et analysée de la même manière à chaque fois, ce qui évite un biais de manipulation.

Un système de GC-MS est composé de plusieurs éléments. Un gaz conducteur inerte va constituer la phase mobile, c'est à dire qu'il va servir à emmener l'échantillon dans le système d'analyse. Le gaz peut être de l'hélium, de l'hydrogène, du nitrogène ou de l'argon, et il doit être très pur. L'introduction de l'échantillon se fait par un port d'injection chauffé, qui permet la vaporisation rapide de l'échantillon dans le système. Une fois l'échantillon injecté, il va traverser une colonne, placée dans un four chauffé, qui est l'élément central du système. Cette colonne contient un liquide visqueux, la phase stationnaire, qui permet la séparation des composés de l'échantillon basée sur des propriétés physiques et chimiques. Lorsque chaque composé élué arrive jusqu'au détecteur de masse, celui-ci génère un signal. La réponse du détecteur est caractérisée par la sélectivité, qui détermine le type de composés détectés, et la sensibilité, qui définit les niveaux de concentrations détectés. Pour terminer, la station informatique permet l'identification et la mesure de la quantité de chaque composé détecté. Le signal émis par le détecteur est traité sur la station informatique et le chromatogramme est généré, montrant graphiquement la séparation de tous les composés de l'échantillon (**Figure 14**). L'aire, la hauteur et la largeur des pics sont déterminés, ainsi que le temps de rétention de chaque composé identifié. Le temps de rétention est un paramètre qualitatif, qui permet d'identifier les composés de l'échantillon en comparaison à des composés standard dont le temps de rétention est connu. Les aires des pics servent à quantifier le composant retrouvé par rapport à une concentration connue de standard injecté.

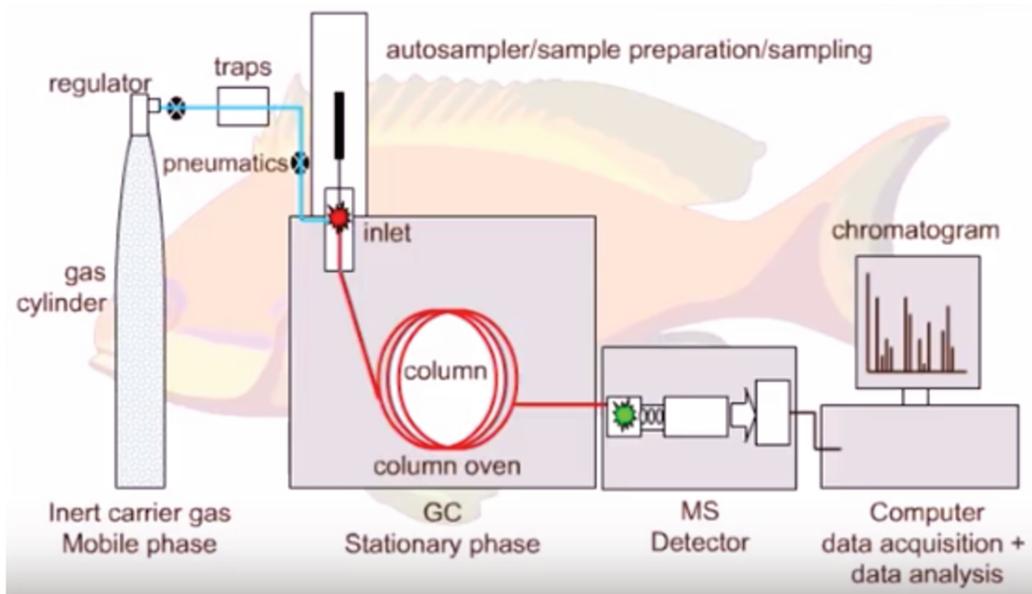


Figure 14. Principe de la GC-MS. Source : <https://www.anthias.co.uk>

Dans l'objectif d'une analyse lipidomique, le principe d'une expérience GC-MS se compose de plusieurs étapes. Dans un premier temps, il est nécessaire d'extraire les AG de l'échantillon à analyser – chimiquement à l'aide de mélanges de plusieurs solvants – puis de séparer les espèces lipidiques extraites par une technique de chromatographie sur couche mince ou chromatographie en phase liquide. La seconde étape est de dériver les AG extraits. Pour cela, les AG doivent être convertis en dérivés apolaires plus volatiles (FAME - Fatty Acid Methyl Ester) qui sont plus faciles à vaporiser et qui peuvent être analysés par GC-MS. En utilisant la GC-MS, les AG sont quantifiés de manière très fiable, par une méthode basée sur le fait que chaque analyte élué est comparé à un analogue (standard interne) ayant des propriétés chimiques et structurales similaires. Ensuite, l'analyse GC-MS à proprement parlé est exécutée selon le principe vu précédemment (**Figure 14**), via 3 étapes principales : la chromatographie en phase gazeuse, la séparation des isomères d'AG dans la colonne et la détection et l'identification des composés par

spectrométrie de masse. Enfin, la quantification des AG est réalisée par comparaison du signal spectrométrique de masse de la molécule cible avec celui d'un standard identique¹⁴².

4.5. Principe général d'un protocole de lipidomique

Un protocole pour une étude lipidomique inclut plusieurs étapes. La préparation des échantillons doit être très reproductible, depuis l'étape de la culture jusqu'à la dérivatisation des AG, en passant par le quenching métabolique et l'extraction des AG. Le passage des échantillons en GC-MS est très reproductible du fait de l'automatisation du système, qui permet de contrôler la quantité d'échantillon injectée. Le logiciel d'analyse qui permet de visualiser les données acquises par le système permet également de contrôler les paramètres de la GC pendant la durée de l'acquisition (température, flux de gaz, etc), et d'optimiser les données obtenues (aires des pics par exemple). Enfin les données obtenues sont soumises à une analyse statistique univariée, qui nous permet d'établir avec certitude des histogrammes représentatifs de la composition en lipides d'un échantillon donné **(Figure 15)**.

Objectifs du travail de thèse

Nous avons précédemment établi une revue générale de la littérature nous permettant de mieux aborder la notion de dérégulation métabolique dans les LAM. Depuis quelques années, de nombreuses équipes scientifiques à travers le monde ont mis en évidence un lien entre la perturbation du métabolisme cellulaire et le développement de cancers, dont les leucémies aiguës, qui sont des cancers très agressifs. Les nombreux composants cellulaires et leurs voies de signalisations, ainsi que les différents mécanismes de régulation décrits dans cette revue montrent la complexité de ces différents systèmes qui sont tous reliés les uns aux autres.

Le principal objectif de ce travail de thèse était d'étudier les dérégulations du métabolisme des cellules leucémiques *via* différentes approches, afin d'avoir une image générale des différentes anomalies retrouvées dans les LAM dans le but d'identifier des voies spécifiques altérées qui pourraient potentiellement ouvrir des pistes à de nouvelles approches thérapeutiques. Nous nous sommes focalisés dans une première partie sur l'étude du métabolisme des cellules de cinq lignées modèles représentant différents sous-types de LAM, cytologiquement et génétiquement différentes les unes des autres, afin d'avoir une idée globale des dérégulations potentielles dans cette pathologie. Le comportement de ces différentes cellules a été étudié avant et après un stress métabolique induit – la carence en sérum – qui avait pour but de mimer l'environnement particulier dans lequel les cellules leucémiques prolifèrent dans l'organisme.

Dans un deuxième temps, pour confirmer nos hypothèses établies sur les lignées cellulaires, nous avons analysé le métabolisme de cellules de moelle osseuse de

patients atteints de LAM. Nous avons appliqué notre méthode précédemment testée et validée sur les lignées à la recherche clinique, dans le but de caractériser les changements au niveau métabolique dans une cohorte large de patients, représentée par différents sous-types de la pathologie, différentes mutations génétiques et différents pronostics.

Enfin, dans une dernière partie, nous avons approfondi l'étude des dérégulations du métabolisme observées dans les cellules primaires de patients, afin d'analyser plus en détails les anomalies retrouvées, pour mettre en lumière quelques approches concrètes dans le but d'aider au diagnostic et au traitement des LAM. Pour cela, deux cibles ont été choisies, et les résultats préliminaires présentés dans la dernière partie de ce travail de thèse. A terme, l'étude de l'impact de ces dérégulations devrait permettre de définir des stratégies thérapeutiques anti-tumorales adaptées aux caractéristiques métaboliques des blastes.

Partie 1 : L'activation différentielle des voies métaboliques dans les lignées cellulaires leucémiques

1. Contexte

La compréhension des dérégulations métaboliques décrites dans les LAM nécessite d'étudier en amont les caractéristiques métaboliques de modèles cellulaires *in vitro*. La première partie de ce travail de thèse a consisté en l'étude de 5 modèles cellulaires de leucémies aiguës myéloïdes, qui se distinguent les uns des autres par des caractéristiques morphologiques et génétiques différentes, permettant de nous rapprocher de la diversité des sous-types de LAM chez les patients. L'apport de la technique de RMN-HRMAS dans l'aide à la compréhension du métabolisme cellulaire est un point clé de cette étude, faisant de nos résultats des résultats originaux qui nous ont permis d'élucider certains mécanismes responsables des dérégulations métaboliques dans les cellules leucémiques. Dans un premier temps, les lignées cellulaires de LAM ont été analysées dans leur état basal, c'est à dire cultivées en milieu de croissance classique selon les recommandations des fournisseurs. Dans un second temps, un stress métabolique a été appliqué aux différentes lignées pour mimer l'environnement médullaire dérégulé dans lequel les cellules leucémiques prolifèrent. Par exemple, en supprimant le sérum du milieu de culture, nous avons pu analyser le comportement de ces cellules leucémiques en situation de carence, afin de mieux comprendre l'impact de ce stress métabolique et de mettre en lumière les mécanismes de reprogrammation métabolique que les blastes mettent en jeu pour assurer leur survie.

2. Résumé

Dans cette étude, nos recherches se sont focalisées sur la comparaison des profils métaboliques de cellules leucémiques modèles, en condition de culture basale et en situation de stress métabolique représentée par la carence en sérum. Nous avons utilisé une approche métabolomique non ciblée, *via* la RMN du proton, couplée à une méthode HRMAS. Une analyse statistique multivariée a été effectuée sur les profils métaboliques de cinq lignées cellulaires (KG1, K562, HEL, HL60 et OCI-AML3), dans le but de trouver des biomarqueurs sous ou surexprimés dans ces différentes lignées modèles en fonction des conditions de culture. A l'état basal, chaque lignée cellulaire présentait une signature métabolique spécifique, reliée à la diversité des sous-types de LAM représentés ainsi qu'à leurs phénotypes. Lorsqu'elles ont été cultivées dans un milieu carencé en sérum, les lignées ont montré une rapide adaptation métabolique à leur nouvel environnement, et ont continué de proliférer et de survivre malgré le manque de nutriments essentiels. L'augmentation de deux métabolites, la phosphocholine (PC) et le glutathion (GSH), est une caractéristique d'adaptation métabolique commune aux cinq lignées, avec une augmentation maximum d'expression à 24h de culture en milieu sans sérum. Ceci suggère une implication du métabolisme phospholipidique, ainsi que des régulateurs du stress oxydatif dans le mécanisme de survie développé par les cellules leucémiques. Notre étude a apporté de nouveaux éléments pour comprendre les mécanismes de leucémogénèse, et suggère une hiérarchie des voies métaboliques activées dans les cellules leucémiques, dont certaines sont dépendantes du génotype (caractéristiques de base), et d'autres représentent des mécanismes communs d'adaptation à un stress métabolique induit par le microenvironnement.



The differential activation of metabolic pathways in leukemic cells depending on their genotype and micro-environmental stress

Caroline Lo Presti^{1,2} · Florence Fauvelle^{3,4} · Julie Mondet^{2,5} · Pascal Mossuz^{1,2}

Received: 11 July 2019 / Accepted: 3 January 2020
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

Introduction Acute myeloid leukemia (AML) is characterized by a set of malignant proliferations leading to an accumulation of blasts in the bone marrow and blood. The prognosis is pejorative due to the molecular complexity and pathways implicated in leukemogenesis.

Objectives Our research was focused on comparing the metabolic profiles of leukemic cells in basal culture and deprivation conditions to investigate their behaviors under metabolic stress.

Methods We performed untargeted metabolomics using ¹H HRMAS-NMR. Five human leukemic cell lines—KG1, K562, HEL, HL60 and OCIAML3—were studied in the basal and nutrient deprivation states. A multivariate analysis of the metabolic profile was performed to find over- or under- expressed metabolites in the different cell lines, depending on the experimental conditions.

Results In the basal state, each leukemic cell line exhibited a specific metabolic signature related to the diversity of AML subtypes represented and their phenotypes. When cultured in a serum-free medium, they showed quick metabolic adaptation and continued to proliferate and survive despite the lack of nutrients. Low apoptosis was observed. Increased phosphocholine and glutathione was a common feature of all the observed cell lines, with the maximum increase in these metabolites at 24 h of culture, suggesting the involvement of lipid metabolism and oxidative stress regulators in the survival mechanism developed by the leukemic cells.

Conclusions Our study provides new insights into the metabolic mechanisms in leukemogenesis and suggests a hierarchy of metabolic pathways activated within leukemic cells, some dependent on their genotypes and others conserved among the subtypes but commonly induced under micro-environmental stress.

Keywords Acute myeloid leukemia · Metabolomics · HRMAS-NMR · Metabolic pathways

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11306-020-1633-z>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Caroline Lo Presti
clopresti@chu-grenoble.fr

- ¹ Department of Biological Hematology, Grenoble Alpes University Hospital, Grenoble, France
- ² UGA/INSERM U1209/CNRS 5309, Institute for Advanced Biosciences, Grenoble, France
- ³ UGA/INSERM U1216, Grenoble Institute of Neurosciences, Grenoble, France
- ⁴ UGA/INSERM US17, Grenoble MRI Facility IRMaGe, Grenoble, France
- ⁵ Molecular Pathology Laboratory, Grenoble Alpes University Hospital, Grenoble, France

1 Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) consists of a set of malignant proliferations that lead to immature myeloid progenitor cells, which have completely or partially lost their differentiation capacity, getting accumulated in the bone marrow, peripheral blood and, potentially, in other organs. Roughly half of AML cases display chromosomal abnormalities (translocations, inversions, etc.), and the other half is cytogenetically normal with one or several mutations. A large number of these recurrent balanced cytogenetic abnormalities are recognized in the WHO's (World Health Organization) classification of AML (Arber et al. 2016). Besides cytogenetic abnormalities, myeloid leukemia cells display numerous genetic alterations, with somatic mutations occurring

alone or in combinations (Döhner et al. 2017), leading to functional deregulations that promote cell proliferation.

It is well known that the metabolism of cancer cells is strongly modified by these deregulations as compared to normal cells. One of the mechanisms involved is metabolic reprogramming, which concerns the modified activities of conventional metabolic pathways in tumor cells because of oncogenic mutations and/or other factors (Pavlova et al. 2016). An example of a metabolic reprogramming is the Warburg effect, which enables cancer cells to adapt their metabolism to proliferate and survive regardless of oxygenation conditions (DeBerardinis et al. 2016). IDH mutation provides a more recent and significant example of the link between metabolism and leukemogenesis (Ferret et al. 2018). This somatic mutation induces phenotype-associated DNA hypermethylation through a decrease in TET2 enzymatic activity as well as deregulation in the ROS production and redox balance through an increase in the oncometabolite 2-hydroxyglutarate (2-HG) instead of the α -ketoglutarate production (Montalban-Bravo et al. 2018). Interestingly, the significance of metabolic deregulation determined by the level of 2-HG produced by tumoral cells seems correlated to the disease's prognosis.

Metabolites, which are the end products of metabolism, could provide important clues to better characterize the metabolic reprogramming developed by cancer cells to gain clonal dominance. Metabolomics involves the global exploration of all the metabolites detectable in a biological sample; i.e., small molecules with a molecular weight lower than 1000 daltons (Markley et al. 2017). Thus, metabolomics provides “an instantaneous snapshot” of all cascades of molecular events linked to cellular metabolic activity (Zhang et al. 2013). Nuclear magnetic resonance (NMR) is particularly well-suited for metabolomics and its clinical applications as it is highly robust, reproducible and non-destructive. Moreover, the HRMAS (high-resolution magic angle spinning) method enables the direct analysis of cells without the chemical extraction of metabolites (Beckonert et al. 2010), and the sample can be stored for traceability purposes after the analysis. Multivariate statistical analyses such as the principal component analysis (PCA) and orthogonal projection to latent structures discriminant analysis (OPLS-DA) can then be applied to the NMR data to find specific metabolic fingerprints to extract the most discriminant metabolites (putative biomarkers) of a given process.

AML studies have already been carried out using this approach. Wang et al. (2013) have shown significant metabolome differences between AML patients and healthy controls, and Musharraf et al. (2016) also found some differences involving aberrant metabolism pathways including glycolysis, TCA cycle, lipoprotein changes, choline and fatty acid metabolisms. Moreover, Wojtowicz et al. (2018) have found a set of metabolites in the comparison of healthy

controls and AML patients, which represent the most important changes that occurred.

In our study, we aimed to investigate the metabolic signature of leukemic progenitors. Through HRMAS-NMR, we investigated five different human leukemic cell lines, representative of different subtypes of AML (i.e., defined by different morphological, cytological and genetic characteristics), in basal conditions of culture. We also studied the behavior of these cell lines in a nutrient-depleted medium for 48 h to evaluate the metabolic mechanisms developed by leukemic progenitors to survive under conditions of metabolic stress. Through this, we demonstrated that leukemic progenitors display significant metabolic reprogramming that gives them a proliferative advantage even under nutrient stress conditions.

2 Materials and methods

2.1 Cell lines

The cells were purchased from the ATCC (American Type Culture Collection) society. HL60 corresponds to human promyelocytic leukemia cells with NRAS gene mutation (Eskandarpour et al. 2009). HEL are erythroblast-like cells, displaying JAK2V617F mutation (Basquiera et al. 2009). KG1 represents undifferentiated myeloblasts and displays NRAS mutation and the FGFR1OP-FGFR1 fusion gene (Popovici et al. 1999). K562 are cells derived from chronic myeloid leukemia (CML) and transformed in AML, with BCR-ABL chromosomal rearrangements (De Braekeleer et al. 2011). Last, OCIAML3 displays NPM1 gene mutation—which plays a role in many cellular functions like DNA replication, cell cycle (Li et al. 2006) and apoptosis (Box et al. 2016)—and DNMT3A mutation, which is involved in DNA methylation (Challen et al. 2012; Han et al. 2019).

For basal state comparisons, the cells were cultured at a density of 5×10^5 cells/mL for exponential growth in a medium containing RPMI 1640, FBS 10%, P/S 1% + L-Glutamine 1% in an autoclave at 37 °C and 5% CO₂. For the serum-free experiment, the cells were cultured in a depleted medium containing RPMI 1640, L-glutamine 1%, P/S 1% and insulin-transferrin-selenium (ITS) 1%. ITS is a basal medium supplement used to reduce the quantity of FBS, which is necessary for the culture. In this depleted medium, the cells were cultured at different times and densities: 3×10^5 cells/mL for 2 h, 4×10^5 cells/mL for 24 h and 5×10^5 cells/mL for 48 h.

2.2 Flow-cytometry assays

The apoptosis assays and cell-cycle experiments were performed using the BD Pharmingen FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit and BD Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit, respectively (Becton Dickinson Biosciences). Flow cytometry was performed on a BD FACS Canto™ II cytometer, and all the data were analyzed using the BD FACS-Diva™ software (V8, Becton Dickinson).

2.3 HRMAS NMR-based metabolomics

2.3.1 Sample preparation

Approximately 4–5 million cells were centrifuged for 10 min at 2000 rpm in culture flasks to obtain at least 3 million cells after centrifugation for the HRMAS-NMR insert. Three washes were performed for 10 min for each wash at 2000 rpm: one with PBS and two with cold (4 °C) deuterated PBS (PBS powder diluted in D₂O, 0.01 mg for 1 mL). After the washes, the cells were suspended in a few microliters of cold deuterated PBS to obtain a total sample volume of 30 µL and then transferred into a disposable insert. The inserts were stored at –80 °C until acquisition. Twelve inserts were prepared for the basal ($n=2$) and stress experiments ($n=1$).

2.3.2 Acquisition parameters

All the ¹H NMR experiments were performed using a Bruker 500 Avance III spectrometer (IRMaGE, CEA-Grenoble). Just before acquisition, the sample was inserted into a 4 mm zirconium rotor, which was immediately transferred to the magnet. The MAS spin rate was set to 4000 Hz and sample temperature to 277 K. A CPMG acquisition sequence was used to attenuate the signal from the lipids and macromolecules present in the sample (total echo time: 30 ms). Each acquisition lasted 17 min.

2.3.3 Data processing

2.3.3.1 Pre-processing of spectra All the HRMAS NMR spectra were corrected for phase and baseline distortions using Topspin™ (V 3.5, Bruker Biospin), and the spectral region between 0.8 and 8.7 ppm was divided into buckets with an equal width of 0.001 ppm using NMRProcFlow 1.2 Online (<https://nmrprocflow.org/>). The regions δ 4.6–5.3, δ 3.35–3.40, δ 3.65–3.75, δ 3.79–3.93 and δ 3.95–4.03 were discarded to eliminate the residual water peak and remove the pollution signal. Each bucket was normalized to the total sum of buckets. The peak assignment was based on 2D experiments (HSQC and TOCSY), databases (e.g. HMDB Human Metabolome Database) and literature.

2.3.3.2 Multivariate statistics Multivariate analyses were conducted using the SIMCA® 14.1 software (Umetrics, Sweden). The OPLS-DA models were built, and the score was plotted with the first two components. The total number of components was determined using the cross-validation procedure, which produces the R₂Y and Q₂ factors that indicate the goodness of the fit and predictability of the model. After back-transformation, the loadings were plotted as an “S-line”—i.e., the 1D loading plot with each variable color-coded for their correlation coefficients—thereby mimicking a “statistical” spectrum. The color-coded variables indicated the significance of the metabolites contributing to the intergroup differentiation with a “hot” colored (e.g., red) metabolite being more significant than a “cold” colored (e.g., blue) one. Metabolites with correlation > 0.5 were considered for further univariate analyses.

2.3.3.3 Univariate statistics The sum of buckets for one isolated peak or a part of a non-overlapping peak of each identified metabolite was used for the univariate statistics. The amplitude of the most discriminant metabolites (correlation > 0.5 and peak with the smallest overlap possible, see Figure S1) were used in a one-way ANOVA analysis and Tukey test for pairwise comparisons with the software Graph Pad Prism®.

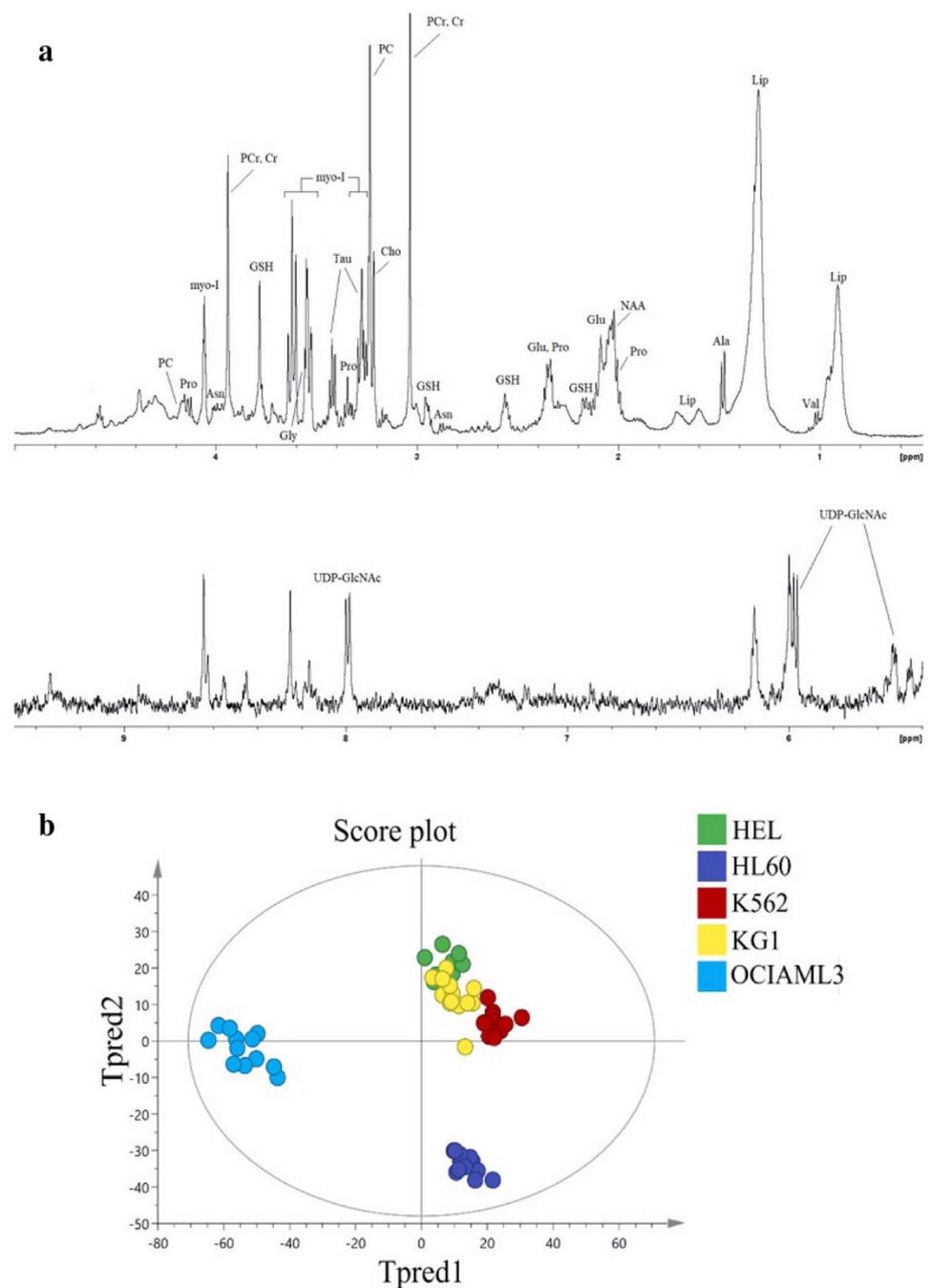
2.3.3.4 Heat map generation A heat map was generated using XLSTAT. The relative amplitude of each metabolite for all the cell lines was used to build the heat map.

3 Results

3.1 Leukemic cell lines exhibit specific metabolic signatures at the basal state

High-resolution NMR spectra were obtained for each cell line, which enabled the identification of several metabolites. A representative spectrum with the assignment of peaks for the K562 cell line is shown in Fig. 1a as an example. The spectra were all pre-processed and bucketed from 0.8 to 8.7 ppm. Then, the normalized buckets were transferred to SIMCA V 14.1, and a supervised model was built with the data of all the basal state cell lines (Fig. 1b). The model was well fitted (R₂Y = 0.95) and highly predictive (Q₂ = 0.874). We observed a good clustering of each cell line on the score plot, which suggested that they each display a different metabolic profile in their basal states. Moreover, the qualitative differences of the cell lines' metabolites levels were highlighted, each represented by a set of metabolites which differ based on the cell type (Figure S2). However, we observed greater scattering of OCIAML3 and HL60 cells than the other three cell lines.

Fig. 1 **a** ^1H HRMAS NMR spectrum of the K562 cell line; **b** The score plot of the OPLS-DA model built with the spectra of the five cell lines at basal state. This model is well fitted ($R^2Y=0.95$) and robust ($Q^2=0.874$). HL60 and OCIAML3 are clearly distant from the other cell lines. *PC* phosphocholine, *Pro* Proline, *myo-I* myo-inositol, *Asn* asparagine, *PCr/Cr* phosphocreatine/creatine, *GSH* glutathione, *Gly* glycine, *Tau* taurine, *Cho* choline, *Glu* glutamate, *NAA* N-acetyl-aspartate, *Lip* lipids, *Ala* alanine, *Val* valine, *UDP-GlcNAc* UDP-N-acetylglucosamine



As we had no control cell lines, we performed pairwise comparisons. As a prerequisite for the investigation of metabolic specificity, we identified most of the peaks on the NMR spectra based on the chemical shifts (Table S1, Figure S3). The pairwise comparisons (see Table S2) led to the observation that each cell line is characterized by a set of metabolites that is overexpressed in the basal state as compared to the other cell lines. Figure 2a and b represent the spectra of KG1 and OCIAML3 in their basal states and the OPLS-DA model built with the data from 12 samples of each of these two cell lines respectively. On the S-line, we observed that the most discriminant metabolites (i.e., with correlations >0.5) that increased were Tau, Asp, PCr/Cr and

NAA in OCIAML3 and PC in KG1 (Fig. 2c). Asp and Tau were clearly overexpressed in OCIAML3 compared to other cell lines, while PC was mainly overexpressed in KG1 but with less amplitude than Asp, as seen in Fig. 2d. The PCr/Cr level was higher in OCIAML3 than KG1 and very close to the K562 level. The same pairwise comparison procedure was applied for all the cell lines, and the most discriminant metabolites observed are represented by the histograms in Figure S1.

All the above data was summed up in a heat map (Fig. 3a). In the HL60 cells, five metabolites, namely Val, Asn, Gly, Gln and Glu, were overexpressed. The level changes of Gln were four times higher than the other cell

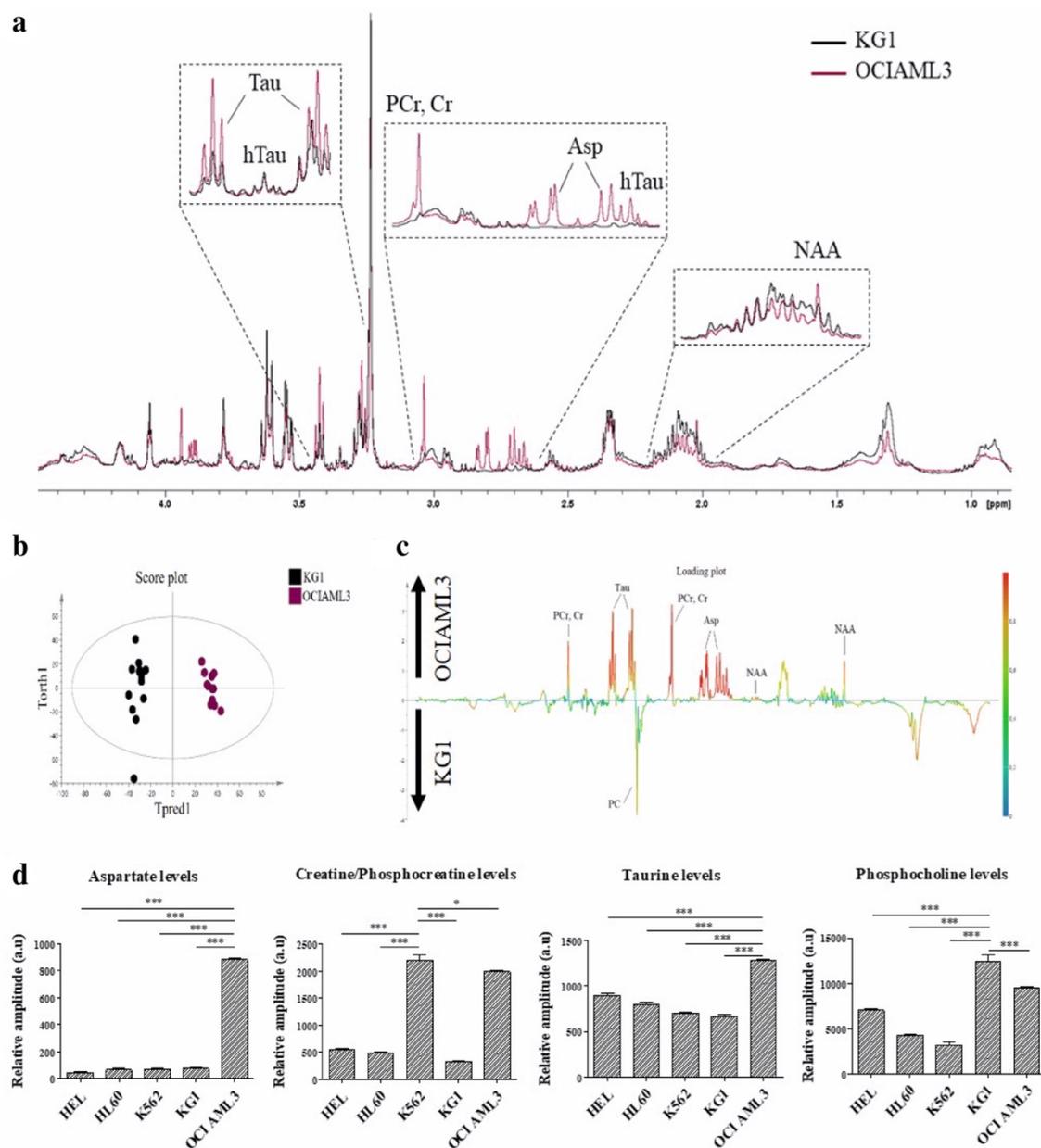


Fig. 2 **a** Metabolic profiles of the KG1 and OCIAML3 cell lines. Inserts with metabolite details are expanded two-fold; **b** OPLS-DA score plot ($R^2Y=0.983$; $Q^2=0.962$); **c** 1D loading plot of the KG1 and OCIAML3 cells showing clearly separated cell lines; OCIAML3 shows higher levels of NAA, Asp, PCr/Cr and Tau and

lower levels of PC than KG1; **d** ANOVA with HL60, HEL, KG1, K562 and OCIAML3 data were performed, followed by a Tukey pairwise comparison: Asp, PCr/Cr, Tau and PC levels are shown here (** $p < 0.001$)

lines, as shown in Fig. 3b. Pro, myo-I and GSH were the most represented metabolites in HEL. In KG1, Cho and PC were overexpressed while Ala and PCr/Cr were at their lowest levels. In K562, we observed an increase of Cho, Ala, PCr/Cr and NAA, while the PC level was the lowest. NAA, Asp, Asn, hypotaurine (hTau) and Tau were overexpressed in OCIAML3, while the level of Cho was the lowest. The specific metabolites for each cell line are represented in Table S3. The most important variation observed was the increase of Asp in OCIAML3, which was 20 to 30 times higher than any other cell line.

3.2 Leukemic cell lines adapt their metabolism to nutrient deprivation

The cancer cells displayed adaptability to metabolic stress. To investigate the mechanisms behind this feature, we performed an HRMAS-NMR analysis on leukemic cells in a serum-free medium.

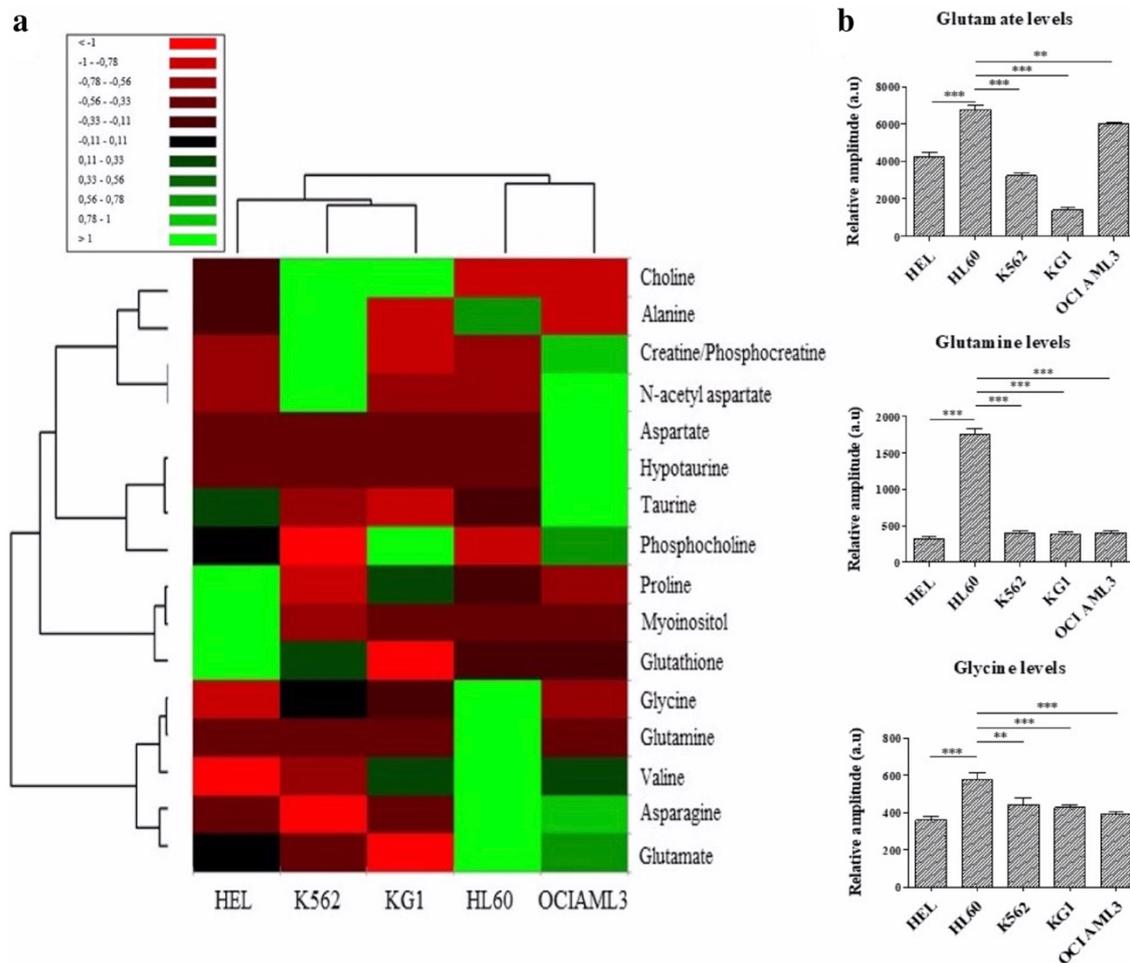


Fig. 3 **a** Heat map of the five cell lines in basal conditions showing the different metabolites studied and their expression in each type of cells; **b** Levels of Gln, Glu and Gly in HL60 cells compared to the

other cell lines (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). NAA and hypotaurine (hTau) have been integrated in the heat map based on whether they are present in the spectra of all the cell lines

3.2.1 Impact on cell cycle and apoptosis

In serum-free conditions, all the cell lines showed a decrease in their proliferation rates and an increase in the death ratio, reaching the maximum level 2 h after starting the starvation. From 24 h to the end of starvation, all the cells recovered their normal proliferation and survival rates, with the percentage of dead cells being close to the basal measurements. At 24 h, over 90% of viable cells were present. At 48 h, they recovered a viability higher than 95%, and their metabolic profiles were close to their normal states (data not shown). Interestingly, no significant impact on the cell cycle was observed at the different time points in serum-free conditions compared to the basal state. At 2 h, 24 h and 48 h of deprivation in the basal state, the cell distribution in the four phases of the evolution cycle was the same for all the observed cell lines.

3.2.2 Impact on basal metabolic profile

We built an OPLS-DA for each cell line using the time points as classification variables (including the basal states for the reference group), and we plotted the individual scores to visualize the evolution of the cells under metabolic stress. For all the cells, we observed a clear “metabolic circuit”, with the basal state being the starting point—and sometimes the end point—of the circuit. We also observed a common feature during starvation, i.e., an early shift in the basal metabolism at 2 h, followed by a progressive return to the basal state at 48 h. This indicated the cells’ tendency to normalize their metabolism. However, each cell line had its own adaptation profile. Some metabolites were increased at 2 h and progressively decreased until 48 h (e.g., Gln, Asn and Gly), while others displayed a strong decrease at 2 h, followed by an increase until 48 h (e.g. Ala and Pro). This

metabolic evolution was clearly observed for the K562 and HEL cell lines, with their 48 h group being very close to the basal group, indicating the normalization of their metabolisms. This was supported by the Ala and Cho levels for K562 and the GSH and Pro levels for HEL, which were very close to their basal states at 48 h. KG1 and HL60 were not completely normalized at 48 h. We observed an incomplete “circuit of evolution” of the HL60 cells under nutrient depletion. The levels of Cho (for KG1) and Val (for HL60), which were lower at 48 h than the basal state value, confirmed this adaptation scheme as the cells took more time to recover (Fig. 4a). The last cell line, OCIAML3, displayed a different adaptation scheme. Its metabolic profile at 2 h had, like the other cells, clearly shifted from the basal state. However, at 24 h, it was very close to basal state group, which indicated that these cells recover much faster than the other cell lines. This was corroborated by the Asp level at 24 h being close to the basal level (Fig. 4b).

3.2.3 Common metabolic adaptation in serum-free conditions

In addition to these cell-line specific metabolite variations, two metabolites, PC and GSH, followed a common evolution pattern in all the cell lines: they increased at 24 h of culture with serum deprivation. We observed a high increase in the GSH and PC resonances on the K562 cell line spectra at different time points (basal, 2 h, 24 h and 48 h), as shown in Fig. 5a. This increase at 24 h of starvation compared to the basal state was significant for all the cell lines (Fig. 5c for GSH and 5d for PC). The circuit of perturbation was clearly observed, with a tendency to recover at 48 h. This evolution was clearly displayed in the OPLS-DA model ($R^2Y = 0.967$; $Q^2 = 0.93$) (Fig. 5b), where the metabolic profile of the K562 cells moved from the basal state to the end of starvation. The same feature was observed for all the cell lines.

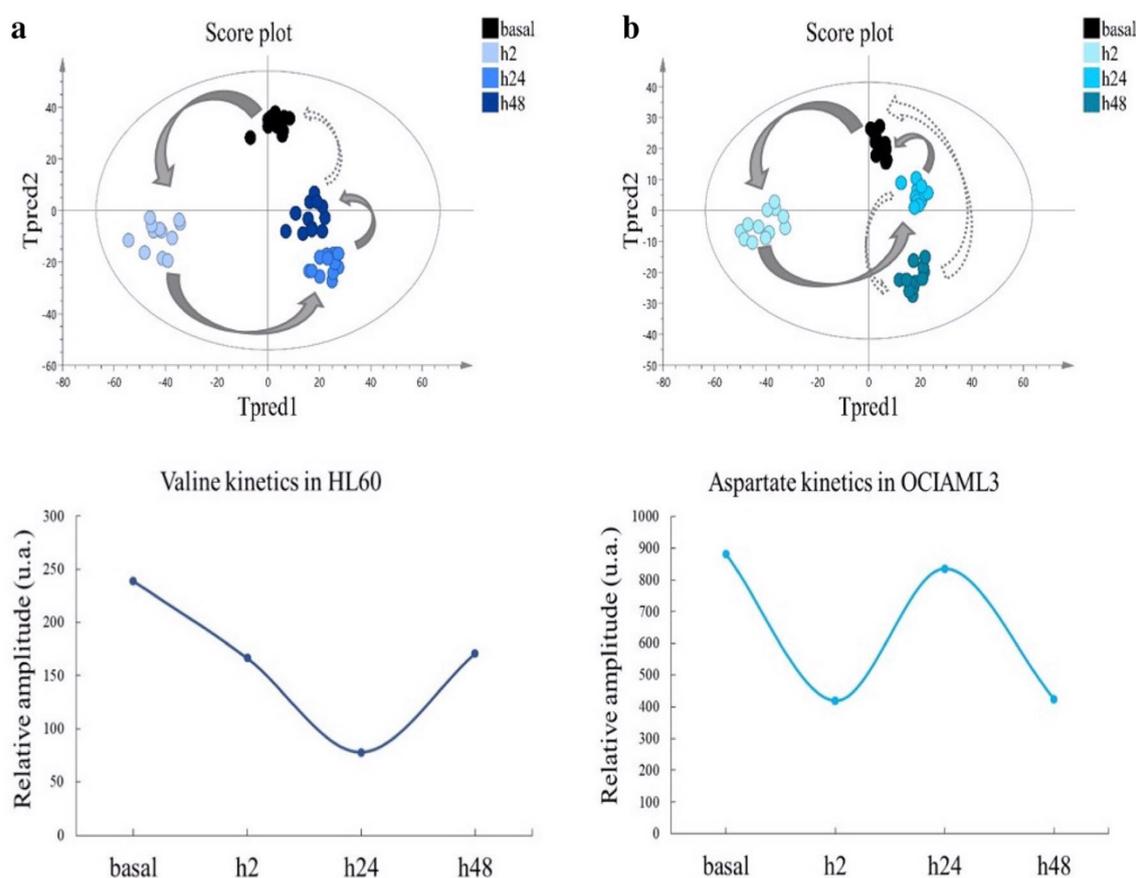


Fig. 4 **a** OPLS-DA score plot ($R^2Y = 0.94$; $Q^2 = 0.836$) and Val kinetics are shown for HL60 cells; Val level at 48 h is lower than basal level. **b** OPLS-DA score plot ($R^2Y = 0.94$; $Q^2 = 0.818$) and Asp kinetics are shown for the OCIAML3 cells. Asp level at 24 h is very

close to the basal value. The solid arrow shows what we observed for the metabolic circuit. The dotted arrow shows what would supposedly happen if there were more time points

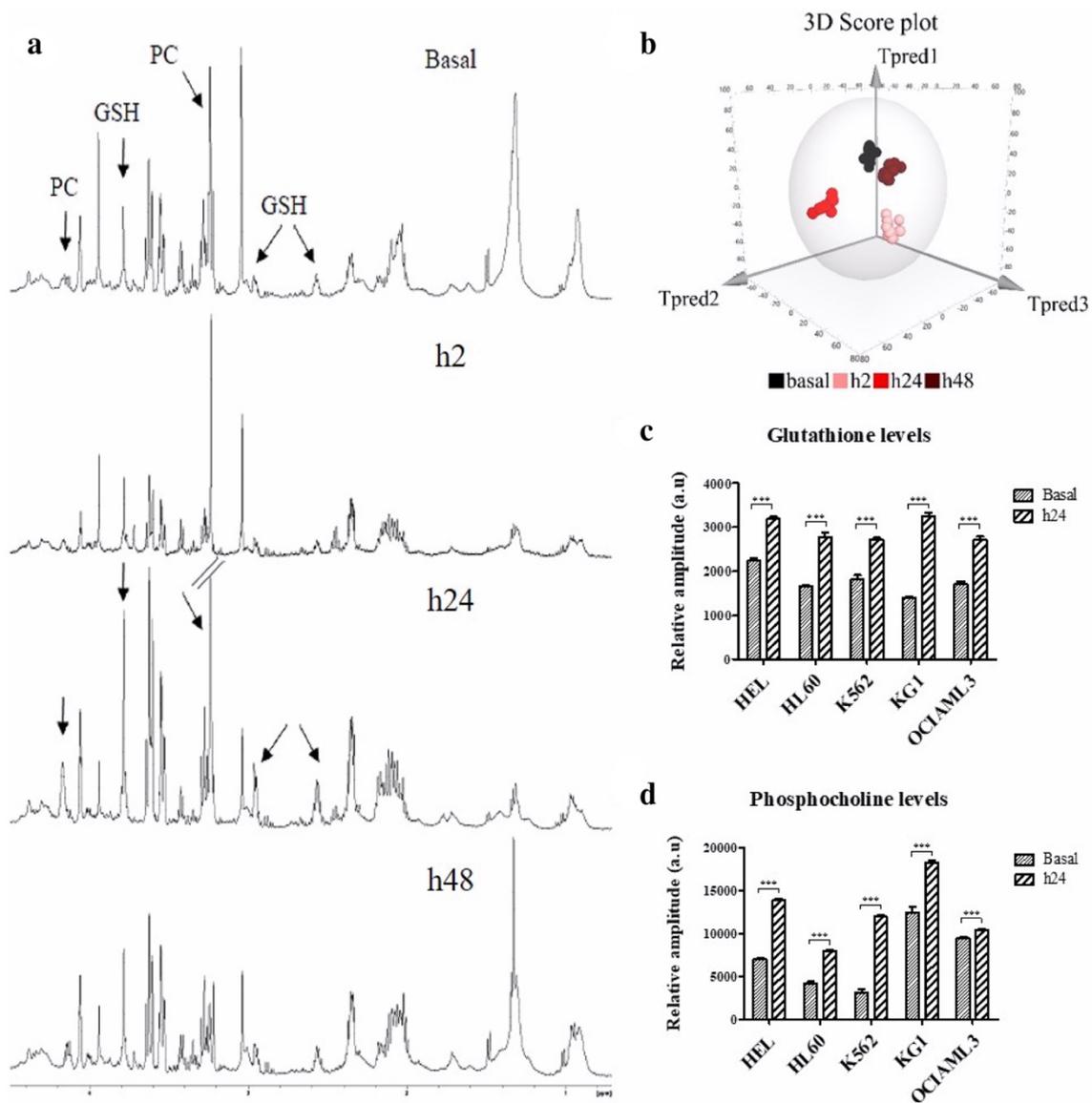


Fig. 5 **a** ^1H HRMAS NMR spectra of the K562 cell line at different time points (basal, 2 h, 24 h and 48 h); PC and GSH are clearly increased at 24 h of starvation. **b** 3D Score plot of the OPLS-DA model ($R^2Y=0.967$; $Q^2=0.93$) built with all the K562 spectra, showing the metabolic evolution from basal state to the end of star-

vation (48 h); samples at 48 h of starvation are close to the samples at basal state. **c** GSH and **d** PC levels for all the cell lines show a significantly increase in these metabolites at 24 h of starvation (***) ($p < 0.001$)

4 Discussion

In recent years, the development of HRMAS NMR-based metabolomics has allowed researchers to better characterize in cellulo metabolic changes associated with cancer. In our study, we used this method to improve the metabolic characterization of leukemic progenitors and decipher the mechanisms developed by leukemic cells to adapt themselves to nutrient stress.

First, we showed that five leukemic cell lines, characterized by genetic and cytological differences, displayed significant differences in their metabolic profiles when they were cultured in the same medium in basal conditions.

We found that HL60, a human promyelocytic leukemia cell line with NRAS gene mutation involved in regulating cell division, was characterized by overexpression of the Val, Asn, Gly, Glu and Gln pathways, the latter three being involved in glutamate metabolism. On the other hand, this cell line has low levels of PCr/Cr, PC and Cho compared to other cell lines. Hernandez-Davies et al. (2015) showed that vemurafenib-resistant cell lines display NRAS mutation, which may influence glutamine addiction in these type of cells. The metabolism of glutamine in cancer cells differs significantly from normal cells. The most important differences include the high utilization of glutamine for fatty acid synthesis and high activity of ATP citrate

lyase (ACL) in the cancer cells, producing cytoplasmatic acetyl-CoA due to a higher demand for fatty acid synthesis (Michalak et al. 2015).

HEL exhibited an overexpression of Pro, GSH and myo-I metabolites. This cell line displays JAK2V617F mutation, and it is known that JAK2, especially JAK2V617F, contributes to the regulation of myoinositol transport in HEL (Hosseinzadeh et al. 2012).

KG1 showed an overexpression of Cho and PC compared to the other cell lines; these are linked to glycerophospholipid metabolism. The FGFR1 mutation, in combination with FGF21, coordinates phospholipid homeostasis and regulates lipid metabolism (Ye et al. 2016). Furthermore, cancer cells in general are highly dependent on de novo lipid synthesis, which is promoted by the PI3K/AKT/mTOR pathway and reflected by the increased expression of lipogenic enzymes such as fatty acid synthase (FAS) (Icard et al. 2012). Therefore, it should be interesting to explore the deregulations in AML lipid metabolism further.

K562 was represented by the overexpression of Cho, Ala, PCr/Cr and NAA. Interestingly, an ¹H NMR study showed an overexpression of Ala in the CML cell line (which also displayed the BCR-ABL mutation) and of the PCr/Cr pool in the imatinib resistant subline, indicating that resistant cells have an alternative source of energy (Dewar et al. 2010).

OCIAML3 with NPM1 mutation displayed strong changes in NAA, Asp, Asn, hTau and Tau. Duan-Porter et al. (2014) recently showed that the wild-type NPM1 is cleaved at two aspartate sites by granzyme B, suggesting this metabolite's involvement in the OCIAML3 phenotype.

Tiziani et al. (2009) have highlighted some differences between AML cell lines at basal state, which are close to our findings. We found several common points between our study and Tiziani's study, including the modifications in the basal metabolism of the cell lines. They presented lower myo-I and PCr/Cr levels in HL60 and a lower level of PC in K562, in comparison with other cell lines. However, we noted a divergence in the basal metabolism of Ala. While Tiziani's study showed an increase of the Ala level in KG1a, we found the opposite in our KG1 cell line. This could be because KG1a is not the same as KG1; KG1a is a subclone of KG1, described as an undifferentiated variant.

All the above data showed that the metabolic characteristics of AML depend on their genetic statuses, making it crucial to better characterize the different metabolic maps developed by leukemic progenitors in order to develop metabolism-targeted therapies to treat patients suffering from AML. The methodology developed in our study could be helpful for studying patients' samples as the number of cells used here is equitable with those obtained from the patients. Moreover, the fact that the samples can be stored after the NMR analysis is important for traceability purposes in a clinical context.

Previous studies have showed that leukemic cells are capable of modifying and adapting their metabolism when their environmental conditions change due to the addition of drugs (Bhanot et al. 2015; Zhang et al. 2016), deprivation of compounds essential to their growth or by making them resistant to a treatment (Stäubert et al. 2015). Stäubert et al. (2015) suggested that glutamine dependence decreases in drug-resistant leukemia cells, causing them to exhibit enhanced glucose dependence and an altered fatty acid metabolism. Interestingly, Tiziani et al. (2009) showed that drugs (bezafibrate combined with medroxyprogesterone acetate) could lead to similar modifications in some metabolites, suggesting that cancer cell lines could develop the same adaptation mechanism after injection of different drugs. This suggests that metabolic pathway remodeling is a major stress adaptation mechanism in cancer cells. Bhanot et al. (2015) found changes in the glycogenesis process of leukemic cells in response to inhibitors of oncogenic tyrosine kinases, particularly that they sustain aberrant proliferation by suppressing excess AMPK activity through an elevation of glycogenesis. Then, Zhang et al. (2016) showed that apoptosis induced by celastrol in HL60 cell lines is mediated by pyrimidine metabolism.

As previously described, leukemia cell lines exhibit a dependence on nutrients to support their proliferation (Suganuma et al. 2010). We induced cellular stress using the starvation method to analyze the metabolic changes that allow leukemic cells to survive and proliferate. Nevertheless, in our study, serum deprivation did not fully stop the proliferation of the cells. We particularly observed that the cells developed the metabolic mechanism at a fast pace (from 2 h), allowing their survival and proliferation despite the lack of nutrients. Interestingly, despite their metabolic and genetic differences in steady state conditions, we observed a common response to nutrient stress in the five leukemia cell lines, suggesting that leukemic cells can develop the same adaptation mechanism in the deprivation conditions that overpasses the basal differences between the cell lines. This effect was characterized by the overexpression of metabolites from the phospholipid pathway and some regulators of oxidative stress, highlighting the role of redox balance regulators in the survival of cancer cells.

Aberrant choline metabolism has been described in many cancers such as ovarian, breast, lung, bladder and colon cancers but not in AML at present (Bagnoli et al. 2016). It is a fairly new metabolic hallmark that reflects the complex reciprocal interactions between oncogenic signaling and cellular metabolism. It causes an increase of PC in malignant cells. An increased intracellular PC level is a common feature of tumoral progression in ovarian cancer (Granata et al. 2014). The elevated PC in our leukemia cell lines could be a potential marker of resistance to stress conditions and aggressiveness. Moreover, leukemic cells display aberrant

glutathione metabolism as an intrinsic property. Indeed, altered redox balances have been reported in many cancers, including AML (Pei et al. 2013; Mondet et al. 2019). Additionally, it has been observed that GSH is a marker of aggressiveness (Lash et al. 2015) and that elevated levels of GSH provide protection against stress-mediated apoptosis (Circu et al. 2008), which is concordant with our findings in the leukemic cells.

5 Conclusion

This study demonstrated the feasibility and contribution of HRMAS NMR-based metabolomics approach when applied to leukemic cell lines. Our data provided original data about the rewired metabolism of leukemic cell lines, and an overview of the metabolites involved in the proliferation of leukemic progenitors. Moreover, we highlighted the significant differences among genetically different human leukemic cells in steady state conditions. We also showed that despite having genetic differences, these progenitors develop specific mechanisms to resist metabolic stress, displaying changes in the metabolites involved in phospholipid metabolism and oxidative stress regulation. This indicates the ability of leukemic cells to quickly adapt to nutrient-poor environments and maintain significant proliferation levels through common mechanisms. A lipidomic study to better characterize the deregulations of the phospholipid metabolism is in progress. Therefore, leukemic progenitors display differential activation of metabolic pathways depending on their genotype and micro-environmental stress in AML.

Acknowledgements We thank Michel Bardet, the head of the laboratory of magnetic resonance at CEA Grenoble and Pierre-Alain Bayle, for his invaluable help during the experiments.

Author contributions PM conducted the study design; CL pretreated the samples; JM provided help during the stress experiments; FF supervised the metabolomics design of the study; and CL performed the HRMAS-NMR and data analyses. All the authors read and approved the manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

Research involving human and animal participants This article does not contain any studies with human and/or animal participants.

References

- Arber, D. A., et al. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, *127*(20), 2391–2405.
- Bagnoli, M., et al. (2016). Choline metabolism alteration: A focus on ovarian cancer. *Frontiers in Oncology*, *6*, 153. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00153>.
- Basquiera, A. L., et al. (2009). Clinical significance of V617F mutation of the JAK2 gene in patients with chronic myeloproliferative disorders. *Hematology*, *14*(6), 323–330. <https://doi.org/10.1179/102453309X12473408860226>.
- Beckonert, O., et al. (2010). High-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues. *Nature Protocols*, *5*(6), 1019–1032. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.45>.
- Bhanot, H., et al. (2015). Pathological glycogenesis through glycogen synthase 1 and suppression of excessive AMP kinase activity in myeloid leukemia cells. *Leukemia*, *29*(7), 1555. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.46>.
- Box, J. K., et al. (2016). Nucleophosmin: From structure and function to disease development. *BMC Molecular Biology*, *17*(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s12867-016-0073-9>.
- Challen, G. A., et al. (2012). Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nature Genetics*, *44*(1), 23–31. <https://doi.org/10.1038/ng.1009>.
- Circu, M. L., & Aw, T. Y. (2008). Glutathione and apoptosis. *Free Radical Research*, *42*(8), 689–706. <https://doi.org/10.1080/10715760802317663>.
- De Braekeleer, E., et al. (2011). ABL1 fusion genes in hematological malignancies: A review. *European Journal of Haematology*, *86*(5), 361–371. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2011.01586.x>.
- DeBerardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances*, *2*(5), e1600200. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600200>.
- Dewar, B. J., et al. (2010). Metabolic assessment of a novel chronic myelogenous leukemic cell line and an imatinib resistant subline by 1H NMR spectroscopy. *Metabolomics*, *6*(3), 439–450. <https://doi.org/10.1007/s11306-010-0204-0>.
- Döhner, H., et al. (2017). Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an International Expert Panel. *Blood*, *129*(4), 424–447. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-733196>.
- Duan-Porter, W. D., et al. (2014). Dynamic conformations of nucleophosmin (NPM1) at a key monomer-monomer interface affect oligomer stability and interactions with granzyme B. *PLoS ONE*, *9*(12), e115062. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115062>.
- Eskandarpour, M., et al. (2009). Oncogenic NRAS has multiple effects on the malignant phenotype of human melanoma cells cultured in vitro. *International Journal of Cancer*, *124*(1), 16–26. <https://doi.org/10.1002/ijc.23876>.
- Ferret Y et al. (2018) Clinical relevance of IDH1/2 mutant allele burden during follow-up in acute myeloid leukemia. A study by the French ALFA Group. *Haematologica*, *103*(5), 822–829. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.183525>.
- Granata, A., et al. (2013). Choline kinase- α by regulating cell aggressiveness and drug sensitivity is a potential druggable target for ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, *110*(2), 330. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.729>.
- Han, M., et al. (2019). Epigenetic enzyme mutations: Role in tumorigenesis and molecular inhibitors. *Frontiers in Oncology*, *9*, 194. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00194>.
- Hernandez-Davies, J. E., et al. (2015). Vemurafenib resistance reprograms melanoma cells towards glutamine dependence. *Journal of Translational Medicine*, *13*(1), 210. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0581-2>.
- Hosseinzadeh, Z., et al. (2012). Down-regulation of the myoinositol transporter SMIT by JAK2. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *30*(6), 1473–1480. <https://doi.org/10.1159/000343335>.

- Icard, P., Lincet, H. (2012). A global view of the biochemical pathways involved in the regulation of the metabolism of cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1826(2), 423–433. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.07.001>.
- June, Li, et al. (2006). Nucleophosmin regulates cell cycle progression and stress response in hematopoietic stem/progenitor cells. *Journal of Biological Chemistry*, 281(24), 16536–16545. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601386200>.
- Lash, L., et al. (2015). Glutathione levels and susceptibility to chemically induced injury in two human prostate cancer cell lines. *Molecules*, 20(6), 10399–10414. <https://doi.org/10.3390/molecules200610399>.
- Markley, J. L., et al. (2017). The future of NMR-based metabolomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 43, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.08.001>.
- Michalak, K. P., et al. (2015). Key roles of glutamine pathways in reprogramming the cancer metabolism. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2015/964321>.
- Mondet, J., et al. (2019). Adult patients with de novo acute myeloid leukemia show a functional deregulation of redox balance at diagnosis which is correlated with molecular subtypes and overall survival. *Haematologica*, 104(9), e393–e397. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.206821>.
- Montalban-Bravo, G., & DiNardo, C. D. (2018). The role of IDH mutations in acute myeloid leukemia. *Future Oncology*, 14(10), 979–993. <https://doi.org/10.2217/fon-2017-0523>.
- Musharraf, S. G., et al. (2016). Serum metabolomics of acute leukemia using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Scientific Reports*, 6(1), 30693. <https://doi.org/10.1038/srep30693>.
- Pavlova, N. N., & Thompson, C. B. (2016). The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metabolism*, 23(1), 27–47. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>.
- Pei, S., et al. (2013). Targeting aberrant glutathione metabolism to eradicate human acute myelogenous leukemia cells. *Journal of Biological Chemistry*, 288(47), 33542–33558. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.511170>.
- Popovici, C., et al. (1999). The t(6;8)(Q27;P11) translocation in a stem cell myeloproliferative disorder fuses a novel gene, FOP, to fibroblast growth factor receptor. *Blood*, 93(4), 1381–1389.
- Stäubert, C., et al. (2015). Rewired metabolism in drug-resistant leukemia cells: A metabolic switch hallmarked by reduced dependence on exogenous glutamine. *Journal of Biological Chemistry*, 290(13), 8348–8359. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.618769>.
- Suganuma, K., et al. (2010). Energy metabolism of leukemia cells: Glycolysis versus oxidative phosphorylation. *Leukemia and Lymphoma*, 51(11), 2112–2119. <https://doi.org/10.3109/10428194.2010.512966>.
- Tiziani, S., et al. (2009). Metabolomic profiling of drug responses in acute myeloid leukaemia cell lines. *PLoS ONE*, 4(1), e4251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004251>.
- Wang, Y., et al. (2013). Rapid diagnosis and prognosis of de novo acute myeloid leukemia by serum metabolomic analysis. *Journal of Proteome Research*, 12(10), 4393–4401. <https://doi.org/10.1021/pr400403p>.
- Wojtowicz, W., et al. (2018). Serum NMR metabolomics to differentiate haematologic malignancies. *Oncotarget*, 9(36), 24414. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25311>.
- Ye, M., et al. (2016). FGF21-FGFR1 coordinates phospholipid homeostasis, lipid droplet function, and ER stress in obesity. *Endocrinology*, 157(12), 4754–4769. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1710>.
- Zhang, A., et al. (2013). Cell metabolomics. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 17(10), 495–501. <https://doi.org/10.1089/omi.2012.0090>.
- Zhang, X., et al. (2016). Metabolomics profiles delineate uridine deficiency contributes to mitochondria-mediated apoptosis induced by celastrol in human acute promyelocytic leukemia cells. *Oncotarget*, 7(29), 46557. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10286>.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Supplementary data

Metabolites (ID) and abbreviation	Chemical shift (ppm) & multiplicity	Buckets (ppm)
Alanine (Ala)	1.48 (d)	1.4653-1.5012
Asparagine (Asn)	2.84 (m), 4.00(dd)	2.8685-2.8984
Aspartate (Asp)	2.66(dd), 2.80 (dd), 3.89(dd)	2.7104-2.7249
Choline (Cho)	3.20 (s)	3.2121-3.2232
Glutamate (Glu)	2.05(m), 2.13(m), 2.35 (m)	2.3190-2.3763
Glutamine (Gln)	2.13(m), 2.45 (m)	2.4216-2.4822
Glutathione (GSH)	2.15(m), 2.54 (m), 2.97(dd), 3.78(m)	2.5147-2.6070
Glycerophosphocholine (GPC)	3.22(s)	Not analyzed
Glycine (Gly)	3.56 (s)	3.5564-3.5667
Hypotaurine (hTau)	2.66(t), 3.34(t)	Not analyzed
Myo-inositol (myo-I)	3.27(t), 3.53(dd), 3.62(t), 4.05 (t)	4.0410-4.0777
N-acetyl-aspartate (NAA)	2.03(s), 2.51(dd)	Not analyzed
Phosphocholine (PC)	3.21 (s), 4.16(m)	3.2249-3.2411
Phosphocreatine/Creatine (PCr, Cr)	3.03 (s), 3.93(s)	3.0249-3.0480
Proline (Pro)	1.99(m), 2.06(m), 2.34(m), 3.33(dt), 3.41(dt), 4.12 (dd)	4.1188-4.1273
Taurine (Tau)	3.25(t), 3.42 (t)	3.4052-3.4163
UDP-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc)	5.50(dd), 5.97(d), 7.95(d)	Not analyzed
Valine (Val)	0.98(d), 1.03 (d)	1.0329-1.0628

Table S1 Metabolites identified with NMR analysis with assigned resonances of detected metabolites in the ¹H HRMAS NMR spectra of cells (s singlet, d doublet, dd doublet of doublets, t triplet, q quadruplet, m multiplet). Chemical shifts are relative to the right peak of alanine doublet (1.475 ppm); the peaks used for the univariate statistics are in bold. For

asparagine, aspartate, glutamate, taurine and proline, only a part of the bold peak (without any overlapping with either a metabolite or a peak of contaminating compound) was considered. The buckets used in the univariate statistics are given for each metabolite we analyzed.

Model (a vs b)	Components (Pred. + Ortho.)	R2Y	Q2	Most discriminant metabolites	
				Increased in a & decreased in b	Decreased in a & increased in b
HEL vs HL60	1+2	0.994	0.959	Myo-inositol	Glutamine Glutamate
HEL vs K562	1+1	0.979	0.932	Myo-inositol	Phosphocreatine Creatine Alanine
HEL vs KG1	1+3	0.999	0.928	Myo-inositol	Phosphocholine
HEL vs OCIAML3	1+1	0.994	0.974	Myo-inositol	Aspartate Taurine N-acetyl-aspartate Phosphocreatine Creatine
HL60 vs K562	1+2	0.993	0.971	Glutamine Glutamate	Phosphocreatine Creatine
HL60 vs KG1	1+3	0.992	0.902	Glutamine Glutamate	Phosphocholine
HL60 vs OCIAML3	1+1	0.996	0.986	Glutamine Glutamate	Aspartate Taurine N-acetyl-aspartate Phosphocreatine Creatine Phosphocholine
K562 vs KG1	1+2	0.983	0.899	Phosphocreatine Creatine Alanine	Phosphocholine
K562 vs OCIAML3	1+1	0.988	0.976	Alanine Choline	Aspartate Taurine N-acetyl-aspartate Glutamate
KG1 vs OCIAML3	1+1	0.983	0.962	Phosphocholine	Aspartate Taurine N-acetyl-aspartate Phosphocreatine Creatine

Table S2 The main properties of all the OPLS-DA models.

Cell lines	Specific metabolites
HL60	Valine ; Asparagine ; Glycine ; Glutamate ; Glutamine
HEL	Proline ; Myoinositol ; Glutathione
KG1	Choline ; Phosphocholine
K562	Alanine ; Creatine/Phosphocreatine ; Choline ; N-acetyl-aspartate
OCIAML3	N-acetyl-aspartate ; Aspartate ; Asparagine ; Hypotaurine ; Taurine

Table S3 The most specific metabolites for all the cell lines.

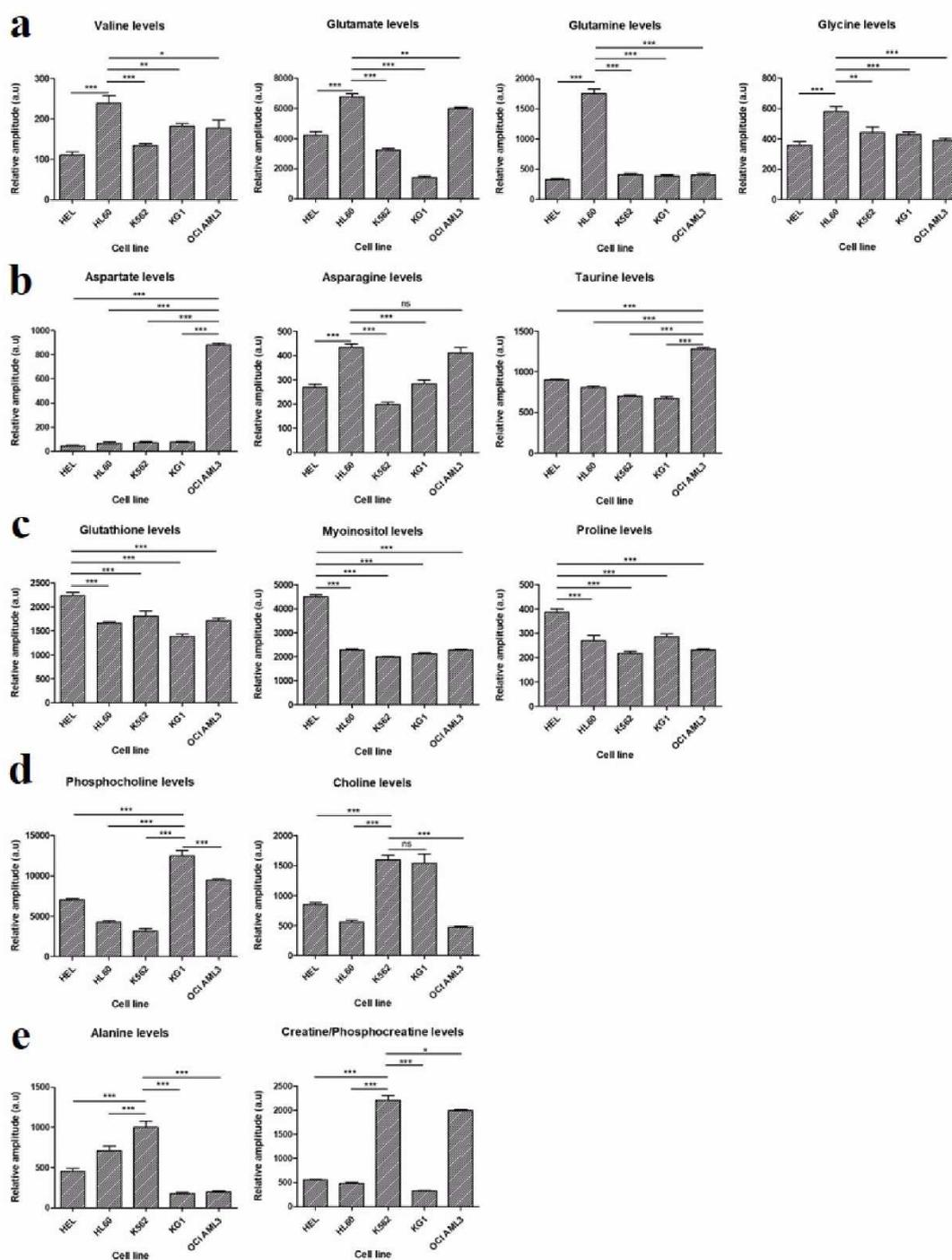


Figure S1 Representative metabolites for each cell line: (a) HL60, (b) OCI.AML3, (c) HEL, (d) KO1, (e) K562. Statistical analyses (t-tests and ANOVAs) of the NMR peak relative amplitude were performed with GraphPad Prism®. The values are mean \pm SE of mean (n=2). (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

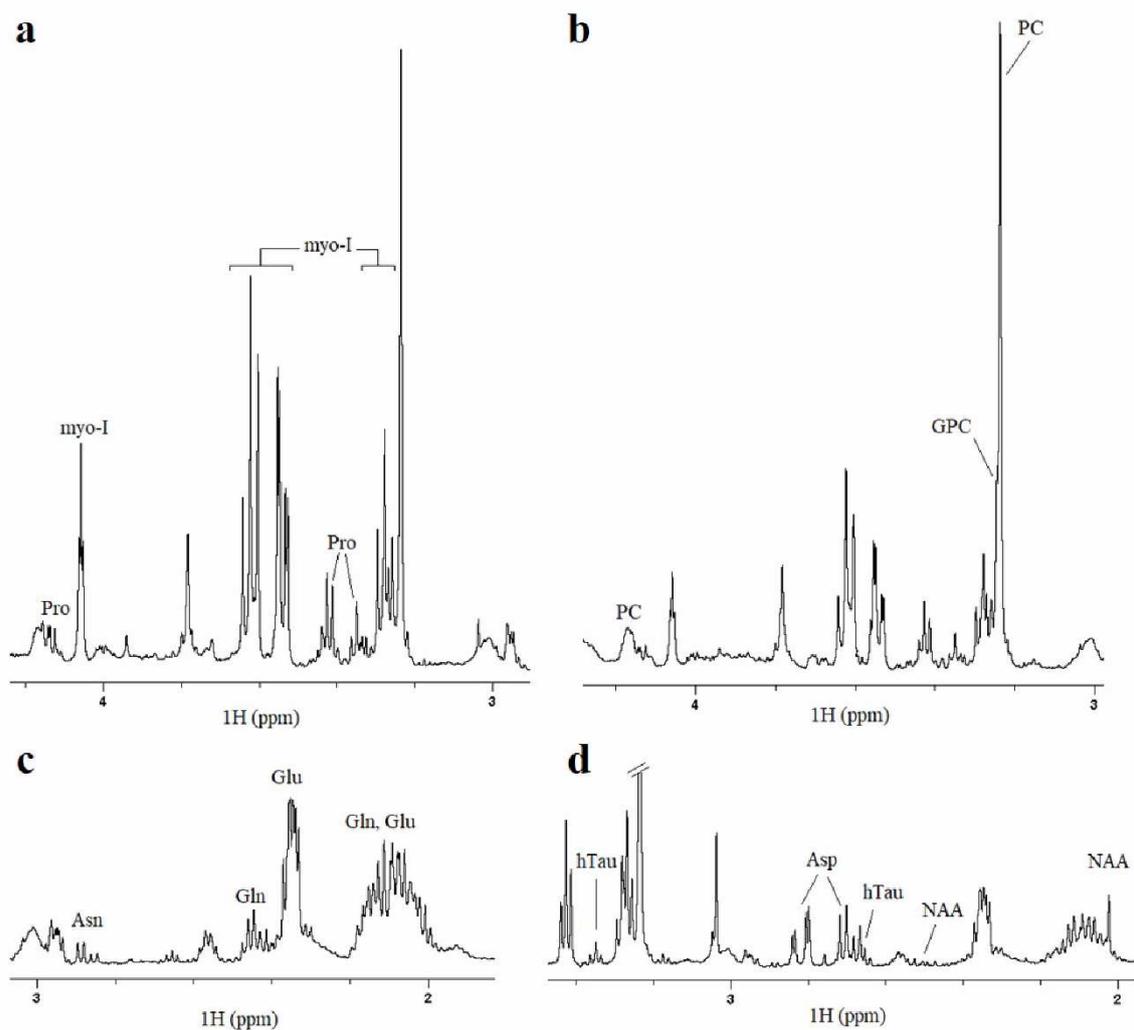


Figure S2 Specific regions showing the most representative metabolites for each cell line (e.g. the metabolites with higher levels for each cell line): (a) HEL, (b) KG1, (c) HL60, (d) OCIAML3. For metabolites' abbreviations, see **Table S1**.

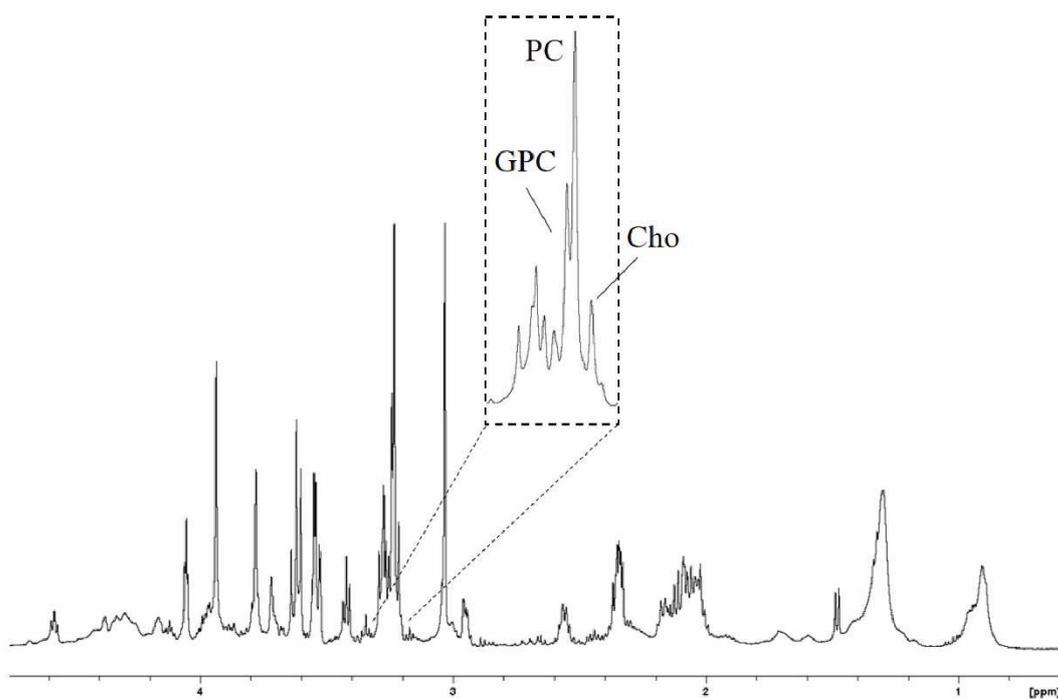


Figure S3 Spectrum section showing the distinction between choline (Cho, 3.20 ppm), phosphocholine (PC, 3.21 ppm) and glycerophosphocholine (GPC, 3.22 ppm).

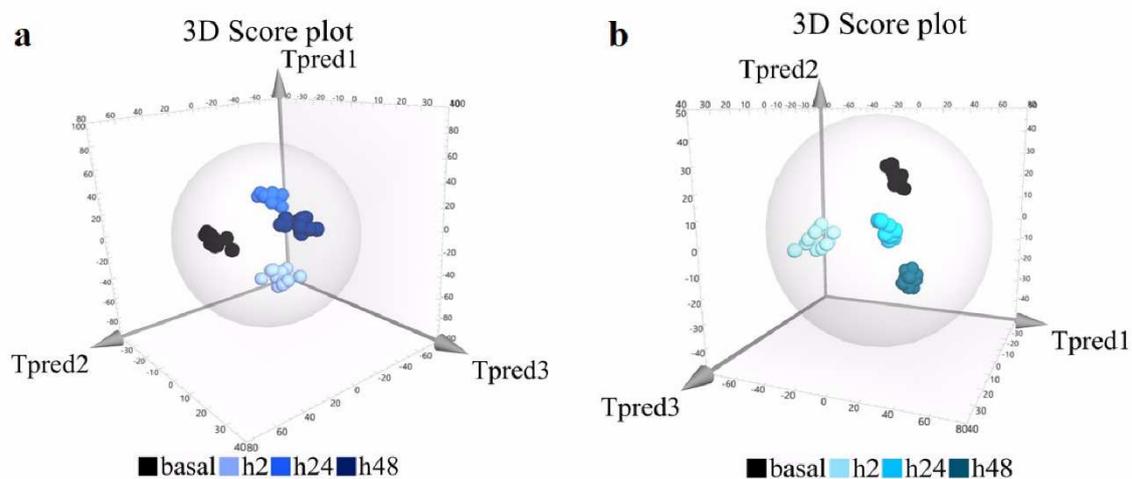


Figure S4 a 3D score plot for the HL60 cell line OPLS-DA model ($R^2Y = 0.94$; $Q^2 = 0.836$).

b 3D score plot for the OCIAML3 cell line OPLS-DA model ($R^2Y = 0.94$; $Q^2 = 0.818$).

Partie 2 : La reprogrammation métabolique des cellules leucémiques de LAM dépend du génotype des patients et influence leur pronostic

1. Contexte

Dans la première partie de ce travail, nous avons montré que chaque lignée cellulaire modèle de LAM présentait une signature métabolique spécifique à l'état basal, mais que toutes développaient un mécanisme commun d'adaptation au stress métabolique. Dans cette deuxième partie, nous avons étudié et interprété les résultats de l'analyse par RMN-HRMAS de prélèvements de moelle osseuse de 54 patients atteints de LAM au moment de leur diagnostic, avant l'induction du traitement. Notre objectif était d'une part de caractériser les profils métaboliques de patients LAM sur des prélèvements *ex vivo*, et d'autre part de corrélérer ces données métabolomiques avec les données clinico-biologiques (phénotype, génotype) et pronostiques à notre disposition. 54 patients pris en charge au CHU Grenoble Alpes ont été inclus dans cette étude, de Juin 2016 à Décembre 2019. Les données obtenues à partir des spectres RMN des patients ont permis d'analyser les informations selon plusieurs critères : le sous-type cytologique de la classification FAB, le groupe pronostique selon la classification de l'ELN 2017, le statut moléculaire (et particulièrement le statut mutationnel de NPM1, FLT3 et IDH), le statut de différents marqueurs immunologiques étudiés par cytométrie en flux, et enfin, la réponse au traitement par chimiothérapie, évaluée à 1 mois post-induction.

2. Résumé

Dans ce travail, nous avons montré qu'au diagnostic, les cellules leucémiques des patients présentaient une grande diversité de profils métaboliques, selon les différents sous-types cytologiques de LAM et leur statut moléculaire. Le lien entre le métabolisme et le statut moléculaire était particulièrement fort pour l'oncométabolite 2-hydroxyglutarate (2-HG), dont la production intracellulaire est directement liée à la présence de mutations des gènes d'isocitrate déshydrogénase. De plus, le pronostic des patients était fortement influencé par plusieurs métabolites, comme le 2-HG qui est apparu comme un bon biomarqueur pronostique dans notre cohorte. À l'inverse, les dérégulations du métabolisme des phospholipides avaient un impact négatif sur le pronostic, à travers deux principaux métabolites (phosphocholine et phosphoéthanolamine), qui pourraient être des biomarqueurs d'agressivité potentiels. Enfin, nous avons mis en évidence une surexpression du glutathion et de l'alanine chez les patients chimiorésistants. Au total, nos résultats démontrent que différentes voies métaboliques sont activées dans les cellules leucémiques des patients LAM selon leur phénotype et de leur niveau de maturation. Ils confirment que ce statut métabolique des cellules leucémiques au diagnostic influence fortement le pronostic des patients même après une chimiothérapie d'induction bien conduite, et ils soulignent le rôle particulier de certains métabolites et des voies associées développés par les cellules leucémiques pour maintenir leur potentiel prolifératif. Ces travaux font l'objet d'une publication en cours de révision dans *Blood Advances* (réponse aux reviewers en cours de rédaction).

The metabolic reprogramming in acute myeloid leukemia patients depends on their genotype and is a prognostic marker

Authors

Caroline Lo Presti^{1,2}, Florence Fauvelle^{3,4}, Marie-Christine Jacob⁵, Julie Mondet^{1,6} and Pascal Mossuz^{1,2}

Affiliations

¹ UGA/INSERM U1209/CNRS 5309, Institute for Advanced Biosciences, Grenoble, France

² Department of Biological Hematology, Grenoble Alpes University Hospital, Grenoble, France

³ UGA/INSERM U1216, Grenoble Institute of Neurosciences, Grenoble, France

⁴ UGA/INSERM US17, Grenoble MRI Facility IRMaGe, Grenoble, France

⁵ Department of Immunology, Grenoble Alpes University Hospital, Grenoble, France

⁶ Molecular Pathology Laboratory, Grenoble Alpes University Hospital, Grenoble, France

Running head The intracellular metabolic reprogramming in AML

Correspondence

Pr Pascal Mossuz

Address: Institut de Biologie et Pathologie CHU Grenoble Alpes, CS 10217 38043 Grenoble Cedex 9

E-mail address: pmossuz@chu-grenoble.fr

Phone number: 04 76 76 54 87 - Fax number: 04 76 76 59 35

Word count

Abstract: 248 words

Main text: 4309 words

Figures: 7

References: 49

Supplemental file associated: 1

Abstract

Leukemic cells display some alterations in metabolic pathways, which play a role in leukemogenesis and in patients' prognosis. To evaluate the characteristics and the impact of this metabolic reprogramming, we explore the bone marrow samples from 54 *de novo* Acute Myeloid Leukemia (AML) patients, using an untargeted metabolomics approach based on proton High Resolution Magic Angle Spinning-Nuclear Magnetic Resonance (HRMAS-NMR). The spectra obtained were subjected to multivariate statistical analysis to find specific metabolome alterations and biomarkers correlated to clinical features. We found that patients display a large diversity of metabolic profiles, according to the different AML cytological subtypes and molecular statuses. The link between metabolism and molecular status was particularly strong for the oncometabolite 2-hydroxyglutarate (2-HG), whose intracellular production is directly linked to the presence of isocitrate dehydrogenase mutations. Moreover, patients' prognosis was strongly impacted by several metabolites, such as 2-HG that appeared as a good prognostic biomarker in our cohort. Conversely, deregulations in phospholipid metabolism had a negative impact on prognosis, through two main metabolites (phosphocholine and phosphoethanolamine), which could be potential aggressiveness biomarkers. Finally, we highlighted an overexpression of glutathione and alanine in chemoresistant patients. Overall, our results demonstrate that different metabolic pathways could be activated in leukemic cells according to their phenotype and maturation levels. This confirms that metabolic reprogramming strongly influences

prognosis of patients and underscores a particular role of certain metabolites and associated pathways in AML prognosis, suggesting common mechanisms developed by leukemic cells to maintain their aggressiveness even after well-conducted induction chemotherapy.

Key points

- Different metabolic pathways are involved in intracellular metabolic reprogramming depending on the genetic characteristics of AML cells.
- Leukemic progenitors activate different programs of the metabolism, depending on their levels of differentiation blockade.

Introduction

Acute myeloid leukemia consists of a set of malignant proliferations that lead to immature myeloid progenitor cells, which have completely or partially lost their differentiation capacity, and get accumulated in the bone marrow, peripheral blood and potentially, in other organs. The incidence is about 3–8 cases/100 000 per year in the world.¹ Historically, AML has several subtypes according to French-American-British (FAB) classification (M0 to M7), representing clonal expansion of malignant hematopoietic cells blocked at distinct differentiation stages along with different lineages.²

Despite the considerable progress in the understanding of the genetic characteristics of AML, we need to go further in the characterization of leukemic cells. Indeed, the main treatment for AML is still based on chemotherapy using a combination of cytosine arabinoside and anthracycline. These drugs have been used as a standard of care for nearly 40 years,³ but the five-year survival remains about 35% in patients under 60 years of age,⁴ conferring to this malignant blood disease a real adverse prognosis. Therefore, new approaches are warranted to better define the prognosis of the patients at diagnosis and to develop drugs targeting mechanism of leukemic initiation and progression.

Mutated genes and/or chromosomal aberrations have been long shown to affect some processes, including signaling pathways or cell differentiation. Subsequently, genetic modifications that induce alterations in epigenetic control of gene expression, RNA splicing or regulation of immune response have been described.⁵ Indeed, a part of the immunosuppression in AML may be directed by genetic aberrations and simultaneously by some metabolites.⁶ In addition, and in complement to these functional alterations, metabolic reprogramming was determined to be a major contributor to the leukemic process.

In a general way, cancer cells are characterized by a quick and uncontrolled proliferation and had a reduced/altered dependence to external stimuli. In order to supply cells in nutrients and energy needed for their growth and division, several mechanisms are involved. Beyond the Warburg effect, which allows introducing the concept of the metabolic reprogramming, other metabolic pathways are strongly altered in cancers. In AML, the leukemic cells produce reactive oxygen species (ROS), which could promote blast proliferation.⁷ Particularly, it seems that the aggressiveness and poor prognosis linked with FMS-like Tyrosine kinase 3-Internal Tandem Duplication (FLT3-ITD) AML are due to the increase in endogenous ROS.⁸ The leukemic cells could have a high oxidative phosphorylation activity, associated to the chemoresistance.⁹ Our team recently showed that *de novo* AML patients had a deregulated redox balance, which was linked to their molecular status and played a major role in their prognosis.¹⁰ Isocitrate dehydrogenase (IDH) mutations provide a significant example of the link between metabolism and leukemogenesis.¹¹ These mutations play a crucial role in the modification of energetic metabolism in leukemic cells and in deregulation of ROS production, generating 2-HG instead of α -ketoglutarate (α -KG) when the gene is mutated.¹² Moreover, glutamine (Gln) is particularly involved in metabolic reprogramming. The leukemic cells use this metabolite as a carbon source for energy production through the TCA cycle and redox homeostasis. Also, Gln is an important metabolite for glutathione (GSH) synthesis, making it an essential element in the redox balance control in AML. The link between glutaminolysis and TCA cycle activity appears to be essential in cell survival,¹³ since Gln is a source of α -KG, which can be converted into 2-HG by IDH mutants.¹⁴

In this context of deregulated metabolism in leukemic cells, HRMAS-NMR is particularly well-suited for metabolomics investigations as it is highly robust, reproducible and non-destructive. This method is well appropriated to semi-solid samples' analysis and allows us to be close to *in vivo* conditions. Moreover, the HRMAS method is very rapid and allows the direct analysis of the samples, without the need for a prior step of chemical extraction of metabolites,¹⁵ which helps avoid some bias. Limited NMR or mass spectrometry-based metabolomics studies on AML patients have already been carried out. Wang et al. and Musharraf et al. have shown significant metabolic differences between AML patients and healthy subjects, involving aberrant metabolic pathways such as TCA cycle, glycolysis or fatty acid metabolism.^{16,17} More recently, another team has found a non-invasive serum metabolite biomarker panel for the detection of AML.¹⁸ In our study, we used HRMAS-NMR to show that, in the basal state, human leukemia cell lines exhibit a specific metabolic signature related to the diversity of AML subtypes represented and their phenotypes. Moreover, when cultured in a serum-free medium, they showed quick metabolic adaptation and continued to proliferate and survive despite the lack of nutrients.¹⁹

In the present study, using the same method, we aimed to better characterize metabolic pathways deregulated in leukemic cells to find discriminant metabolites correlated to the prognosis of *de novo* adult AML at diagnosis. In a prospective study, we investigated the metabolic profiles of AML patients and explored their different metabolic specificities, according to the different FAB subtypes of AML – used as markers of the cellular differentiation, the ELN-prognostic group (European Leukemia Net), the molecular statuses (NPM1 [Nucleophosmin 1], FLT3-ITD and IDH mutations), the status of different immunological markers studied by flow cytometry and the response to the chemotherapy induction. We thus established a list of discriminant metabolites having a positive or negative correlation with AML prognosis. In this way, we identified some clues to aid therapeutic decisions and directly target the altered metabolic pathways in AML.

Materials and methods

Patients' inclusion and sample collection

54 patients were recruited between June 2016 and December 2019 from Grenoble-Alpes University Hospital, in accordance with the ethical standards and the Declaration of Helsinki. The selection criteria were the diagnosis of *de novo* AML with bone marrow blasts higher than 20% and age above 18 years old. The patients with secondary AML or acute promyelocytic leukemia were not included in this study. The bone marrow samples were collected in BD Vacutainer[®] tubes before chemotherapy induction. All patients received a standard “7 + 3” scheme of induction.

HRMAS NMR-based metabolomics

Sample preparation

Bone marrow samples were pre-treated and mononuclear cells isolated by the Ficoll gradient. The cells were suspended in few microliters of cold deuterated PBS and transferred into an insert for MAS rotor (total volume 30 μ L), which were stored at -80°C until acquisition by HRMAS-NMR. One to three inserts per patient were prepared (depending on available sample).

Acquisition parameters

All the ^1H NMR experiments were performed using a Bruker 500 Avance III spectrometer (IRMaGE, CEA-Grenoble). Just before acquisition, the sample was inserted into a 4-mm zirconium rotor, which was immediately transferred to the magnet. The MAS spin rate was set to 4000 Hz and sample temperature to 277 K. A CPMG acquisition sequence was used to attenuate the signal from the lipids and macromolecules present in the sample (total echo time 30 ms). Each acquisition lasted 17 minutes.

Pre-processing of spectra

All the HRMAS-NMR spectra were corrected for phase using Topspin[™] (V 3.5, Bruker Biospin). All further pre-processing steps (baseline correction, chemical shift alignments) and bucketing were performed using NMRProcFlow 1.2 Online (<https://nmrprocflow.org/>). The spectral region between

0.8 and 8.7 ppm was divided into buckets with an equal width of 0.001 ppm. The regions δ 4.6–5.3, δ 3.35–3.40, δ 3.65–3.75, δ 3.79–3.93 and δ 3.95–4.03 were discarded to eliminate the residual water peak and to remove the pollution signal, corresponding to the peaks of a polyethylene glycol component. Each bucket was normalized to the total sum of buckets. The peak assignment was based on 2D experiments (HSQC and TOCSY), databases (e.g., HMDB Human Metabolome Database) and literature.

Statistical analysis

Multivariate analyses were conducted using the SIMCA[®] 16.1 software (Umetrics, Sweden). The Orthogonal Projection to Latent Structure with Discriminant Analysis (OPLS-DA) models were built with HRMAS-NMR data and with group belonging, depending on the condition studied. The total number of components was determined using the cross-validation procedure, which produces the R²_Y and Q² factors that indicate respectively the goodness of the fit and predictability of the model. A model is considered as robust and predictive when both are ≥ 0.5 . The scores were plotted in 2D with the first two components, while the loadings were plotted in 1D to mimic a spectrum. Furthermore, each NMR variables were color-coded according to their correlation with group belonging, with a “hot” colored (e.g., red) metabolite being more significant than a “cold” colored (e.g., blue) one. Metabolites with correlation > 0.5 were considered for further univariate analyses. Moreover, univariate statistics (t-tests, two-way ANOVA and survival analysis) were conducted with GraphPad Prism[®] (**Supplemental methods**).

Immunophenotyping by flow cytometry

Bone marrow aspirate was collected in BD Vacutainer[®] tubes for routine analysis. The sample was analyzed within 8 hours after the aspiration. The cells were numerated using the ABX MICROS 60 (HORIBA ABX SAS, Montpellier, France) cell counter. Then, the following antibodies were tested on all the patient’s samples: CD34-APC-A750 (581; Ref B92463; Beckman Coulter), MPO-PE (Kit

CD3/MPO/CD79a; 5B8; Ref 333164; BD Biosciences), CD14-V450 (M ϕ P9; Ref 560349; BD Biosciences), CD300e-APC (UP-H2; Ref 130-101-773; Miltenyi Biotec), CD117-APC (104D2; Ref 333233; BD Biosciences), CD133-PE (AC133; Ref 130-080-801; Miltenyi Biotec) and CD45-V500 (HI30; Ref 560777, BD Biosciences). The cells were stained by direct immunofluorescence during 15 minutes in the dark at room temperature. After this incubation, the erythrocytes were lysed and the samples were washed with BD FACS™ Lysing Solution (Ref 349202; BD Biosciences) and PBS, respectively. The analyses of the samples were performed on FACSCanto-II™ flow cytometer with three lasers and eight colors (BD Biosciences). Finally, the data were analyzed using BD FACSDiva Software v6 (BD Biosciences). Blast cells were identified by CD45/SSC gating, as these cells are CD45^{low}. This gating procedure improved the phenotypic determination of the leukemic clone.

Data sharing statement

For original data and procedures, please contact florence.fauvelle@univ-grenoble-alpes.fr.

Results

Patients' characteristics

At diagnosis, the median age was 62 years with a sex ratio of 1.7, indicating a masculine predominance. The leukocytosis was variable, with patients having a leukocyte rate in peripheral blood between 4 and 30 10³/ μ L predominantly. AML subtypes were defined according to the FAB classification. The most represented subtype was M2 (43% of the patients), while the least represented subtype was M0 (6% of the patients). Concerning the blast percentage in bone marrow, 16 patients had more than 80%, 11 between 60 and 80%, 14 between 40 and 60% and 13 between 20 and 40% of BM blasts. Prognostic groups were defined according ELN risk stratification: favorable, adverse and intermediate, based on their karyotypes and associated mutations. AML patients (n = 54) were divided into the three risk subgroups, favorable (n = 21), adverse (n = 18) and intermediate (n = 15),

respectively. Three genetic abnormalities were studied in our cohort: NPM1, FLT3-ITD and IDH (pooled as IDH1 and IDH2 mutations). Thirty-one percent of the patients were NPM1 mutated, 24% were FLT3 duplicated and 24% were IDH mutated. Other mutations needed to establish the prognostic risk of patients according to the ELN classifications are shown in Supplemental Table 1. Finally, the response to the chemotherapy treatment was evaluated. The patients were considered as chemoresistant in absence of response to the first induction of chemotherapy after 1 month. Thirty-one patients were chemosensitive and seven were chemoresistant (**Supplemental Table 1**).

Patients from different AML FAB subtypes display different metabolic profiles

The metabolites identified in the ¹H HRMAS NMR spectra of cells are presented in Supplemental Table 2. As shown in Figure 1A, on the score plot of the OPLS-DA model built, some patients seemed to display common metabolic characteristics while a general tendency to scattering was observed (**Figure 1A**). This may be due to the presence of 2-HG in high quantity, since IDH mutation was evenly distributed in all AML subtypes. Therefore, when excluding IDH-mutated patients (**Figure 1B**), the OPLS-DA model was much more robust, and a clear separation of the profiles according to the cellular differentiation was found. This result has been confirmed by excluding the 2-HG peak in the statistical model of Figure 1A (**Supplemental Figure S1**).

Metabolomics revealed significant intracellular changes according to the mutational status of patients

Three genetic abnormalities were systematically studied in our cohort. First, we observed NPM1-mutated patients and wild-type-NPM1 patients had a clear different metabolic profile (**Figure 2A**). This is due to a significant decrease of glutamate (Glu), phosphocholine (PC) and phosphocreatine/creatine (PCr/Cr) in NPM1-mutated subgroup, as well as an increase of 2-HG (not significant) and taurine (Tau) in mutated patients compared to wild-type-NPM1 patients (**Figure 2B**).

Concerning the FLT3 status, excellent separation of the FLT3-ITD and FLT3 wild-type subgroups was found (**Figure 3A**), due to a significant increase of alanine (Ala), choline (Cho), phosphoethanolamine (PE) and Tau, as well as a significant decrease of Gln, PCr/Cr and scyllo-inositol (scyllo-I) in the FLT3-ITD patients as compared to FLT3 wild-type patients (**Figure 3B**).

Last, as expected, a clear clustering between IDH-mutated and wild-type-IDH patients was observed on the OPLS-DA model on **Figure 4A**, since the 2-HG is only present in mutated group and then emerged as the most discriminant metabolite between the two subgroups ($p < 0.0001$). No significant difference was observed between the IDH1 and IDH2 mutations ($p = 0,47$; data not shown). Moreover, a significant decrease of Ala, Glu, GSH, PC and PE was also measured in the mutated patients (**Figure 4B, C**), suggesting that IDH mutation induces remodeling of several metabolic pathways. All the metabolic changes according to the mutational statuses were detailed in Supplemental Table 3.

Metabolic profile is linked to the differentiation stage of leukemic cells

Several variations of the metabolic profile, according to the FAB subtype, suggested that differentiation stage of leukemic cells could influence their metabolic characteristics. Therefore, we analyzed metabolic profiles according to the characteristic immunophenotyping of blast cells determined for each patient at diagnosis. We first compared patients with a CD34⁺/MPO⁻ phenotype, corresponding to immature AML to those with the phenotype CD34⁻/MPO⁺, corresponding to more mature AML. An increase in aspartate (Asp) level was observed in patients with immature AML, whereas the patients with more mature AML were mainly characterized by an increase of 2-HG (**Figure 5A**). Then, we were interested by AML differentiated in the monocytic lineage (M4 and M5). Hence, we analyzed the CD14 and CD300e status, and Gln appeared as a marker of the monocytic cells, corresponding to the phenotype CD14⁺/CD300e⁺, whereas proline (Pro) was mainly increased in monoblastic cells, corresponding to the phenotype CD14⁻/CD300e⁻ (**Figure 5B**). No differences were found concerning the other tested antibodies and other analyzed metabolites.

Impact of metabolism on prognosis in *de novo* AML

We further tested the potential interest of metabolomics for AML prognosis. For that aim, we first built an OPLS-DA model with the two subgroups favorable and adverse risk, and we next predicted the prognosis of patients classified in the intermediate prognostic subgroup. First, we observed that patients in these two favorable and adverse risk groups had clearly different metabolic profiles (**Figure 6A**), mainly due to higher intracellular levels of Asp and GSH (**Figure 6B**) in the adverse group compared to the favorable group. While predicting intermediate patients without prior knowledge using the adverse-favorable OPLS-DA model, we found 53% of them classified as favorable ($n = 8$) and 47% classified as adverse ($p < 0,05$, exact Fisher test) (**Figure 6C**). Until now, among the seven patients with intermediate prognoses, which were predicted as adverse by the model, six are unfortunately dead. Then, among the eight patients predicted as favorable prognosis, five of them are still alive.

Following this, the patients' responses to chemotherapy was analyzed. A great difference between metabolic profile of chemosensitive and chemoresistant patients was seen in the OPLS-DA model (**Figure 7A**). In the differentially expressed metabolites, we observed an increase in Gln and scyllo-I ($p = 0.05$) in chemosensitive patients. On the other side, an increase in GSH and Tau levels was measured in chemoresistant patients, like in those with an adverse prognosis, and a significant increase in Ala ($p < 0.01$) level, like in FLT3-ITD patients (**Figure 7B, C**).

Finally, as 2-HG was clearly linked to the presence of IDH mutation and because this mutation has been reported as a prognostic marker, we evaluated the prognostic value of 2-HG intracellular level. We observed that patients with adverse prognosis displayed lower levels of 2-HG, compared to favorable prognosis. To confirm the interest of 2-HG level, we used the optimal threshold point of 1160 units identified using ROC analysis to generate a Kaplan-Meier curve. A better survival after 3.7 years was highlighted in AML patients who displayed higher levels of 2-HG, even though it was not significant ($p = 0.11$) (**Supplemental Figure S2**). Moreover, to evaluate a potential impact of disease burden, we studied the correlation between the blast number and 2-hydroxyglutarate level. The results clearly show the absence of correlation ($R^2 = 0.09$).

Discussion

In recent years, the development of HRMAS-NMR-based metabolomics has led to a better characterization of the cancer-associated metabolic changes *in cellulo*. In this original study, this method has been used to refine our knowledge about the metabolic characteristics of leukemic cells in order to elucidate the mechanisms developed by these leukemic cells to promote their proliferation and the impact of these deregulations on patients' prognosis. The use of advanced statistics, such as OPLS-DA, was essential and powerful in separating unwanted variance – due to the variability between patients' lifestyle, regimen or age – from the variance due to genetic status, prognostic risk or response to chemotherapy.

The global analysis of the metabolites found in the leukemic samples shows an important variation in their expression between all the patients. Large differences between FAB subtypes were identified first which is consistent with the fact that FAB subtypes of AML represent different cellular types, linked to the differentiation and maturation stage of the leukemic cells. Moreover, we observed that the differences among FAB subtypes are clearly more significant when the oncometabolite 2-HG is excluded from the analysis. The impact of 2-HG on the statistic model seems logical because its production was found in a large amount within IDH-mutated patients that were present in all the AML subtypes at diagnosis.

Next, we explored the mutational status for the three genes, NPM1, FLT3 and IDH. Metabolic alterations were found, which can be correlated to the patients' genotypes. Regarding the IDH mutations, the link between the molecular status and the metabolism has been largely described in the last decade.^{20,21} Previous studies have highlighted a 20- to 50-fold variation of 2-HG levels in sera, urine and marrow aspirate in IDH-mutated vs non-mutated patients.²²⁻²⁴ In our study, we found the same range of expression of 2-HG and we especially showed, for the first time in our knowledge, that IDH mutations induce a significant accumulation of 2-HG into the cells. Moreover, using ROC analysis, we identified a 2-HG threshold allowing for the distinction between IDH-mutated and wild-type-IDH patients with a specificity close to 100%. In addition to the variation of 2-HG levels, we highlighted significant variations in other metabolites levels in IDH-mutated patients, suggesting an

impact of IDH status on various metabolic pathways. Indeed, we observed some deregulations in the amino acid metabolism, with a reduction of Glu and GSH levels in IDH-mutated patients. The same observations were recently described in gliomas.²⁵ In connection with that, Gln was found to be a good prognostic biomarker (although it was usually associated with heightened aggressiveness), since it is found to be increased in FLT3 wild-type and IDH-mutated patients, as well as in chemosensitive patients. This can be explained that by the fact that Gln is a primary carbon source for the biosynthesis of 2-HG in mutant IDH tumors, which was highlighted by *in vivo* imaging on mice.²⁶

Concerning the FLT3 and NPM1 mutations, the metabolic alterations were less specific, probably because these genes have no direct impact on key enzymes of metabolism. The significant variation of several metabolites observed in mutated vs non-mutated patients for these two genes could reflect more the general metabolic adaptation, e.g., the FLT3-driven increase of proliferation, with an acceleration of the membrane phospholipids production in FLT3-ITD patients. Indeed, FLT3 mutation in AML led to a more important proliferation and differentiation in cancer cells, increasing their survival and decreasing the apoptosis.^{27,28} Further, the mutation in NPM1 gene induced the assembly of a large number of proteins required for ribosomal biosynthesis. Hence, this mutation was found to contribute to the cellular growth and proliferation.²⁹

Further, we attempted to correlate the metabolic characteristics of patients with the differentiation phenotype of leukemic cells and found that the 2-HG was overexpressed in patients with CD34⁺/MPO⁺ phenotype, among the AML subtypes M0, M1 and M2. It appeared that 2-HG was most representative of the advanced stages of differentiation in these subtypes, with 11 of our 13 patients mutated for the IDH gene (85%) who were classified as M1 or M2 subtypes at diagnosis. The same has been already described in child AML³⁰ patients and adult patients.³¹ Among M4 and M5 patients, Gln was found to overexpress in patients harboring CD14⁺/CD300e⁺ phenotype, corresponding to monocytic cells. Zellner et al. highlight that monocytes are the main cells that utilize Gln as an important energy substrate.³² Moreover, it was described in hepatocarcinoma cells that Gln was mainly increased at the mature stage of the cancer.³³

As the activation and the deregulation of metabolic pathways are processes developed by cancer cells to promote their survival – thus promoting disease progression – it is likely that the overexpression of certain metabolites can impact patients' prognoses;³⁴ the present study shows results to support the same. With respect to prognostic analysis, the metabolic profiles of the patients classified under favorable and adverse risk as well as those of chemosensitive and chemoresistant patients display significant differences. Interestingly, the same metabolites were overexpressed in adverse prognostic subgroup and in chemoresistant patients, particularly the GSH level. This metabolite appeared as a poor prognostic biomarker, suggesting that leukemic cells had an aberrant glutathione metabolism. Based on the literature, an increase in this metabolite is associated with a strongly proliferative response, which is essential for cell cycle progression.³⁵ This increase can be correlated with the number of patients in relapse. The patients in the adverse prognostic group are at a greater risk of relapse than others because of their complex karyotype and associated mutations.³⁶ Moreover, GSH increase is a major factor contributing to the drug resistance through different mechanisms. This metabolite can be linked or can react with drug substances, interact with the ROS and also help avoid DNA damages.³⁵ A high expression of glutathione-S-transferase combined with high GSH levels can increase the conjugation and detoxification rate of chemotherapy agents, considerably decreasing their efficacy.³⁷ Furthermore, oxidized glutathione levels at diagnosis were lower in survivors vs non-survivors patients suffering from AML.¹⁰

We have further highlighted alterations in the expression of some phospholipids (PC, PE) related to the prognoses and genotype of the patients. Notably, phospholipid metabolism is frequently altered in cancers. Specifically, the choline kinases, which transform choline into PC, can be overexpressed which leads to an increase in PC levels, which in turn plays an important role in cell transformation and cancerous proliferation.³⁸ High levels of PE indicate an intense cellular proliferation, frequently observed in cancers, associated with a PC increase.³⁹ Ackerstaff et al. showed elevated levels of PE and PC in breast cancer tissues as compared to healthy tissues.⁴⁰ In AML, Wang et al. observe that PC was expressed at higher level in sera of patients with intermediate risk, as compared to favorable risk.¹⁶ More recently, a lipidomic approach was performed to help the stratification of AML patients⁴¹

and a novel link between phospholipid metabolism and AML stemness was uncovered, thereby providing a potential therapeutic target for AML.⁴² Lastly, in neurological oncology, studies show that patients suffering from high-grade glioma have higher levels of PE and PC than those with low-grade glioma.^{43,44} More recently, Viswanath's team observed that *de novo* synthesis of PE and PC as well as choline and ethanolamine kinases activity decreased significantly in patients with IDH-mutated glioma. They have established a link between this negative regulation and the oncometabolite 2-HG, which would be responsible of these phenomena through Hypoxia Inducible Factor 1 α stabilization⁴⁵. Our results confirm this particular link between 2-HG and phospholipid metabolism in *de novo* AML and provide additional results suggesting that IDH prognostic value could be mediated through phospholipid regulation by 2-HG.

Finally, the level of Ala was found to be higher in FLT3-ITD patients and chemoresistant patients, who can be considered a group of poor prognosis patients. Several publications highlight the fact that Ala is a poor prognostic biomarker, especially Chen et al., who claim that in mitochondrial DNA mutant cells that harbor human disease-associated oxidative phosphorylation defects, the increase of cytosolic Ala contributes to the re-oxidation of NADH, which is a source of NADPH production, which leads to the glutathione and lipid biosynthesis.⁴⁶ Indeed, as mentioned before, GSH and lipids synthesis is linked to a poor prognosis. Moreover, another study highlights the fact that there is more pyruvate consumption in aggressive bladder cancer stage, which leads to more Ala generation as a marker of aggressiveness.⁴⁷ Our results thus appear concordant with the role of FLT3-ITD AML in the autophagic flux in leukemic stem cells, which make them resistant to chemotherapy.⁴⁸ In fact, Ala secretion was described as a consequence of cancer cells autophagy.⁴⁹ Altogether, targeting autophagy appears to be a promising lead, especially in FLT3-ITD patients.

Conclusion

Our study provides an overview of the metabolites and metabolic pathways involved in the intracellular metabolic reprogramming in AML blasts. It highlights that different mechanisms,

depending on the genetic characteristics of leukemic progenitors, are activated in AML, particularly proven by the strong link between the modifications of the metabolism and the presence of the IDH mutation. Moreover, the study shows that leukemic progenitors activate different programs of the metabolism, depending on their levels of differentiation blockade. Finally, our data strongly suggests that, besides redox balance, phospholipid metabolism plays a critical role in the leukemic progression, and, therefore, therapy targeting this pathway can potentially improve the prognosis of AML patients.

Authorship contributions

PM conducted the study design; CL pretreated the samples, performed the HRMAS-NMR and conducted data analyses; FF supervised the metabolomics design of the study; MCJ aided in immunophenotyping analyses; and JM aided the experiments. All the authors read and approved the manuscript.

Disclosure of conflicts of interest

The authors declare no competing financial interests.

References

1. Kayser S, Levis MJ. Advances in targeted therapy for acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2018;180(4):484-500. doi:10.1111/bjh.15032
2. Schiffer CA, Stone RM. Morphologic Classification and Clinical and Laboratory Correlates. *Holland-Frei Cancer Medicine 6th edition*. 2003. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13452/>. Accessed August 16, 2019.
3. Roboz GJ. Novel Approaches to the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Hematology*. 2011;2011(1):43-50. doi:10.1182/asheducation-2011.1.43
4. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. Longo DL, ed. *New England Journal of Medicine*. 2015;373(12):1136-1152. doi:10.1056/NEJMra1406184

5. Grove CS, Vassiliou GS. Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer? *Disease Models & Mechanisms*. 2014;7(8):941-951. doi:10.1242/dmm.015974
6. Mendez LM, Posey RR, Pandolfi PP. The Interplay Between the Genetic and Immune Landscapes of AML: Mechanisms and Implications for Risk Stratification and Therapy. *Frontiers in Oncology*. 2019;9. doi:10.3389/fonc.2019.01162
7. Hole PS, Zabkiewicz J, Munje C, et al. Overproduction of NOX-derived ROS in AML promotes proliferation and is associated with defective oxidative stress signaling. *Blood*. 2013;122(19):3322-3330. doi:10.1182/blood-2013-04-491944
8. Sallmyr A, Fan J, Datta K, et al. Internal tandem duplication of FLT3 (FLT3/ITD) induces increased ROS production, DNA damage, and misrepair: implications for poor prognosis in AML. *Blood*. 2008;111(6):3173-3182. doi:10.1182/blood-2007-05-092510
9. Farge T, Saland E, de Toni F, et al. Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. *Cancer Discovery*. 2017;7(7):716-735. doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0441
10. Mondet J, Presti CL, Garrel C, et al. Adult patients with *de novo* acute myeloid leukemia show a functional deregulation of redox balance at diagnosis which is correlated with molecular subtypes and overall survival. *Haematologica*. 2019;104(9):e393-e397. doi:10.3324/haematol.2018.206821
11. Ferret Y, Boissel N, Helevaut N, et al. Clinical relevance of *IDH1/2* mutant allele burden during follow-up in acute myeloid leukemia. A study by the French ALFA group. *Haematologica*. 2018;103(5):822-829. doi:10.3324/haematol.2017.183525
12. Montalban-Bravo G, DiNardo CD. The role of *IDH* mutations in acute myeloid leukemia. *Future Oncology*. 2018;14(10):979-993. doi:10.2217/fon-2017-0523
13. Kreitz J, Schönfeld C, Seibert M, et al. Metabolic Plasticity of Acute Myeloid Leukemia. *Cells*. 2019;8(8):805. doi:10.3390/cells8080805
14. Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 2009;462(7274):739-744. doi:10.1038/nature08617
15. Beckonert O, Coen M, Keun HC, et al. High-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues. *Nature Protocols*. 2010;5(6):1019-1032. doi:10.1038/nprot.2010.45

16. Wang Y, Zhang L, Chen W-L, et al. Rapid Diagnosis and Prognosis of *de novo* Acute Myeloid Leukemia by Serum Metabonomic Analysis. *Journal of Proteome Research*. 2013;12(10):4393-4401. doi:10.1021/pr400403p
17. Musharraf SG, Siddiqui AJ, Shamsi T, Choudhary MI, Rahman A. Serum metabonomics of acute leukemia using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Scientific Reports*. 2016;6(1). doi:10.1038/srep30693
18. Wang D, Tan G, Wang H, Chen P, Hao J, Wang Y. Identification of novel serum biomarker for the detection of acute myeloid leukemia based on liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2019;166:357-363. doi:10.1016/j.jpba.2019.01.022
19. Lo Presti C, Fauvelle F, Mondet J, Mossuz P. The differential activation of metabolic pathways in leukemic cells depending on their genotype and micro-environmental stress. *Metabolomics*. 2020;16(1). doi:10.1007/s11306-020-1633-z
20. Parker SJ, Metallo CM. Metabolic consequences of oncogenic IDH mutations. *Pharmacology & Therapeutics*. 2015;152:54-62. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.05.003
21. Ye D, Guan K-L, Xiong Y. Metabolism, Activity, and Targeting of D- and L-2-Hydroxyglutarates. *Trends in Cancer*. 2018;4(2):151-165. doi:10.1016/j.trecan.2017.12.005
22. DiNardo CD, Propert KJ, Loren AW, et al. Serum 2-hydroxyglutarate levels predict isocitrate dehydrogenase mutations and clinical outcome in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013;121(24):4917-4924. doi:10.1182/blood-2013-03-493197
23. Janin M, Mylonas E, Saada V, et al. Serum 2-Hydroxyglutarate Production in *IDH1* - and *IDH2* -Mutated De Novo Acute Myeloid Leukemia: A Study by the Acute Leukemia French Association Group. *Journal of Clinical Oncology*. 2014;32(4):297-305. doi:10.1200/JCO.2013.50.2047
24. Brunner AM, Neuberg DS, Wander SA, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations, 2-hydroxyglutarate levels, and response to standard chemotherapy for patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2019;125(4):541-549. doi:10.1002/cncr.31729
25. Karpel-Massler G, Nguyen TTT, Shang E, Siegelin MD. Novel IDH1-Targeted Glioma Therapies. *CNS Drugs*. 2019;33(12):1155-1166. doi:10.1007/s40263-019-00684-6

26. Salamanca-Cardona L, Shah H, Poot AJ, et al. In Vivo Imaging of Glutamine Metabolism to the Oncometabolite 2-Hydroxyglutarate in IDH1/2 Mutant Tumors. *Cell Metabolism*. 2017;26(6):830-841.e3. doi:10.1016/j.cmet.2017.10.001
27. Lagunas-Rangel FA, Chávez-Valencia V. FLT3–ITD and its current role in acute myeloid leukaemia. *Medical Oncology*. 2017;34(6). doi:10.1007/s12032-017-0970-x
28. Gallipoli P, Giotopoulos G, Tzelepis K, et al. Glutaminolysis is a metabolic dependency in FLT3ITD acute myeloid leukemia unmasked by FLT3 tyrosine kinase inhibition. *Blood*. 2018;131(15):1639-1653. doi:10.1182/blood-2017-12-820035
29. Heath EM, Chan SM, Minden MD, Murphy T, Shlush LI, Schimmer AD. Biological and clinical consequences of NPM1 mutations in AML. *Leukemia*. 2017;31(4):798-807. doi:10.1038/leu.2017.30
30. Damm F, Thol F, Hollink I, et al. Prevalence and prognostic value of IDH1 and IDH2 mutations in childhood AML: a study of the AML–BFM and DCOG study groups. *Leukemia*. 2011;25(11):1704-1710. doi:10.1038/leu.2011.142
31. Abbas S, Lugthart S, Kavelaars FG, et al. Acquired mutations in the genes encoding IDH1 and IDH2 both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Blood*. 2010;116(12):2122-2126. doi:10.1182/blood-2009-11-250878
32. Zellner M, Gerner C, Munk Eliassen M, et al. Glutamine starvation of monocytes inhibits the ubiquitin–proteasome proteolytic pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2003;1638(2):138-148. doi:10.1016/S0925-4439(03)00062-0
33. Nwosu ZC, Battello N, Rothley M, et al. Liver cancer cell lines distinctly mimic the metabolic gene expression pattern of the corresponding human tumours. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2018;37(1). doi:10.1186/s13046-018-0872-6
34. Chen W-L, Wang J-H, Zhao A-H, et al. A distinct glucose metabolism signature of acute myeloid leukemia with prognostic value. *Blood*. 2014;124(10):1645-1654. doi:10.1182/blood-2014-02-554204
35. Traverso N, Ricciarelli R, Nitti M, et al. Role of Glutathione in Cancer Progression and Chemoresistance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013;2013:1-10. doi:10.1155/2013/972913

36. Bansal A, Simon MC. Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. *The Journal of Cell Biology*. 2018;217(7):2291-2298. doi:10.1083/jcb.201804161
37. Yang P, Ebbert JO, Sun Z, Weinshilboum RM. Role of the Glutathione Metabolic Pathway in Lung Cancer Treatment and Prognosis: A Review. *Journal of Clinical Oncology*. 2006;24(11):1761-1769. doi:10.1200/JCO.2005.02.7110
38. Ramírez de Molina A, Gallego-Ortega D, Sarmentero-Estrada J, et al. Choline kinase as a link connecting phospholipid metabolism and cell cycle regulation: Implications in cancer therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2008;40(9):1753-1763. doi:10.1016/j.biocel.2008.01.013
39. Gibellini F, Smith TK. The Kennedy pathway-De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life*. 2010;n/a-n/a. doi:10.1002/iub.337
40. Ackerstaff E, Glunde K, Bhujwalla ZM. Choline phospholipid metabolism: A target in cancer cells? *Journal of Cellular Biochemistry*. 2003;90(3):525-533. doi:10.1002/jcb.10659
41. Stefanko A, Thiede C, Ehninger G, Simons K, Grzybek M. Lipidomic approach for stratification of acute myeloid leukemia patients. Del Poeta M, ed. *PLOS ONE*. 2017;12(2):e0168781. doi:10.1371/journal.pone.0168781
42. Xu M, Seneviratne AK, Schimmer AD. Phospholipid metabolism regulates AML growth and stemness. *Aging*. 2019;11(12):3895-3897. doi:10.18632/aging.102055
43. Elkhaled A, Jalbert L, Constantin A, et al. Characterization of metabolites in infiltrating gliomas using *ex vivo* ¹H high-resolution magic angle spinning spectroscopy: CHARACTERIZATION OF METABOLITES IN INFILTRATING GLIOMAS. *NMR in Biomedicine*. 2014;27(5):578-593. doi:10.1002/nbm.3097
44. Jalbert LE, Elkhaled A, Phillips JJ, et al. Metabolic Profiling of IDH Mutation and Malignant Progression in Infiltrating Glioma. *Scientific Reports*. 2017;7(1). doi:10.1038/srep44792
45. Viswanath P, Radoul M, Izquierdo-Garcia JL, et al. Mutant IDH1 gliomas downregulate phosphocholine and phosphoethanolamine synthesis in a 2-hydroxyglutarate-dependent manner. *Cancer & Metabolism*. 2018;6(1). doi:10.1186/s40170-018-0178-3
46. Chen Q, Kirk K, Shurubor YI, et al. Rewiring of Glutamine Metabolism Is a Bioenergetic Adaptation of Human Cells with Mitochondrial DNA Mutations. *Cell Metabolism*. 2018;27(5):1007-1025.e5. doi:10.1016/j.cmet.2018.03.002

47. Conde VR, Oliveira PF, Nunes AR, et al. The progression from a lower to a higher invasive stage of bladder cancer is associated with severe alterations in glucose and pyruvate metabolism. *Experimental Cell Research*. 2015;335(1):91-98. doi:10.1016/j.yexcr.2015.04.007
48. Rothe K, Porter V, Jiang X. Current Outlook on Autophagy in Human Leukemia: Foe in Cancer Stem Cells and Drug Resistance, Friend in New Therapeutic Interventions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(3):461. doi:10.3390/ijms20030461
49. Sousa CM, Biancur DE, Wang X, et al. Pancreatic stellate cells support tumour metabolism through autophagic alanine secretion. *Nature*. 2016;536(7617):479-483. doi:10.1038/nature19084

Figure legends

Figure 1. Specific metabolic profile of AML patients according to cellular differentiation of leukemic progenitors (FAB classification). **A.** Score plot of the OPLS-DA model built with HRMAS NMR data of all patients (n = 54) and the different AML subtypes. Based on the model factors ($R^2Y = 0,456$; $Q^2 = 0,306$), we see a tendency to separate the patients' profiles according to their cytological subtypes. Some patients appear to have common features. **B.** Score plot of the same OPLS-DA model as Figure 1A, excluding the IDH mutated patients (n = 41). The model is very robust and predictive ($R^2Y = 0,845$; $Q^2 = 0,601$). The distribution of the metabolic profiles is influenced by the oncometabolite 2-hydroxyglutarate.

Figure 2. Specific metabolic profile of AML patients according to the mutational status of NPM1. **A.** Score plot of the OPLS-DA model built with HRMAS-NMR data of NPM1 wild-type patients (n = 30) and NPM1 mutated patients (n = 17). The model is robust and predictive ($R^2Y = 0,726$; $Q^2 = 0,498$). We see a clear separation between the two groups. **B.** Levels of Glu, PCr, PCr/Cr and Tau in NPM1 wild-type patients, compared to NPM1 mutated patients. Mean value \pm SEM. t test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Figure 3. Specific metabolic profile of AML patients according to the mutational status of FLT3-ITD. **A.** Score plot of the OPLS-DA model comparing FLT3 wild-type patients (n = 32) vs FLT3-ITD patients (n = 13). The model is very robust and predictive ($R^2Y = 0,913$; $Q^2 = 0,713$). The separation between FLT3-ITD patients and FLT3 wild-type patients is clear. **B.** Levels of Gln, PCr/Cr, scyllo-I, Ala, Cho, PE and Tau in FLT3 wild-type patients, compared to FLT3-ITD patients. Mean value \pm SEM. t test, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Figure 4. Specific metabolic profile of AML patients according to the mutational status of IDH.

A. Score plot of the OPLS-DA model comparing IDH wild-type patients (n = 36) vs IDH mutated patients (n = 13). The model is robust and predictive (R²_Y = 0,896; Q² = 0,822), showing a clear separation between IDH mutated and IDH wild-type patients. **B.** 1D loading plot of IDH wild-type and IDH mutated patients, showing the main differences between the two groups. **C.** Levels of Ala, Glu, GSH, PC, PE, 2-HG and scyllo-I in IDH wild-type patients, compared to IDH mutated patients. Mean value ± SEM. t test, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

Figure 5. Changes in metabolites levels according to the immunological status of patients. A.

Levels of Asp and 2-HG metabolites according to the CD34/MPO status in M0, M1 and M2 subtypes, corresponding to immature AML. **B.** Levels of Gln and Pro according to the CD14/CD300e status in M4 and M5 subtypes, corresponding to more mature AML. Mean value ± SEM. Two-way ANOVA test, *** p < 0.001.

Figure 6. Specific metabolic profile of AML patients according to the prognosis (ELN classification).

A. Score plot of the OPLS-DA model comparing adverse (n = 18) vs favorable (n = 21) prognostic groups (R²_Y = 0.751; Q² = 0.472). **B.** Levels of GSH and Asp in favorable group, compared to adverse group. Mean value ± SEM. t test, * p < 0.05, ** p < 0.01. **C.** The prediction of the patients with intermediate risk in the OPLS-DA model built with adverse and favorable subgroups shows a distribution of the half of these patients in favorable risk (n = 8) and the other half in adverse risk (n = 7).

Figure 7. Specific metabolic profile of AML patients according to the response to chemotherapy induction.

A. Score plot of the OPLS-DA model comparing chemosensitive patients (n = 31) vs chemoresistant patients (n = 7). The model is very robust and predictive (R²_Y = 0.865; Q² = 0.641), showing well separated groups. **B.** 1D loading plot of chemosensitive (CS) and chemoresistant (CR)

patients. C. Levels of Gln, scyllo-I, Ala, GSH and Tau in chemosensitive patients compared to chemoresistant patients. Mean value \pm SEM. t test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Figure 1

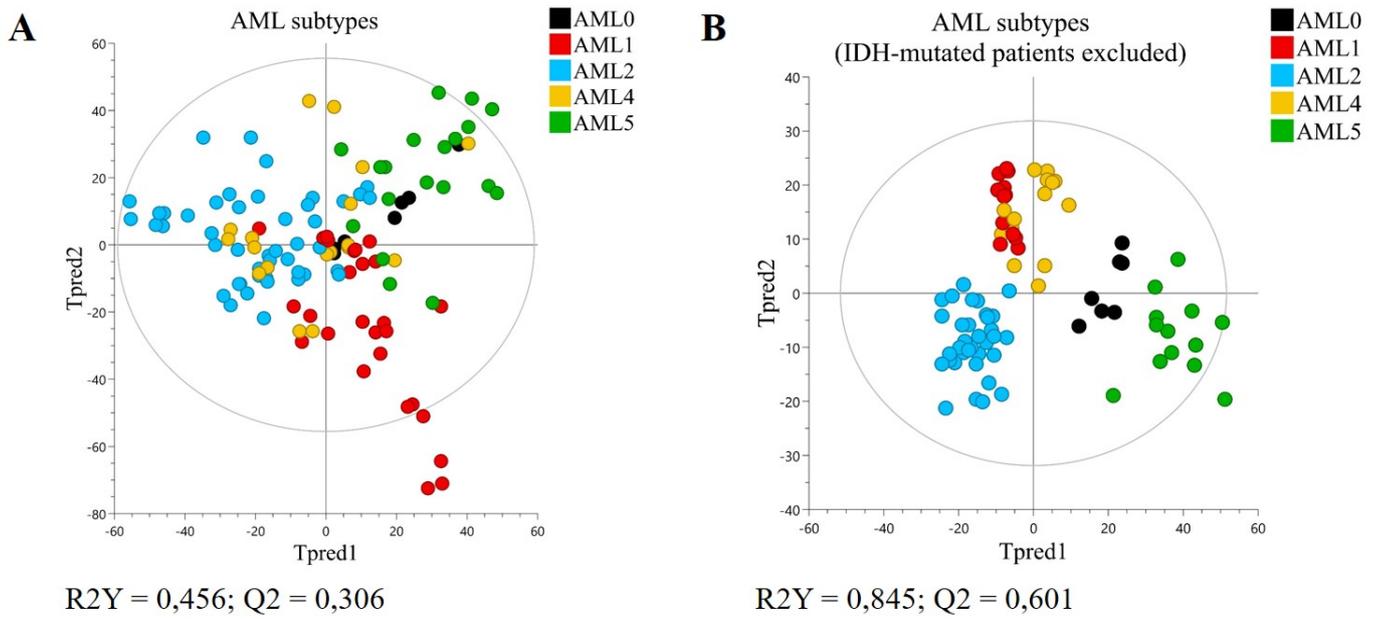


Figure 2

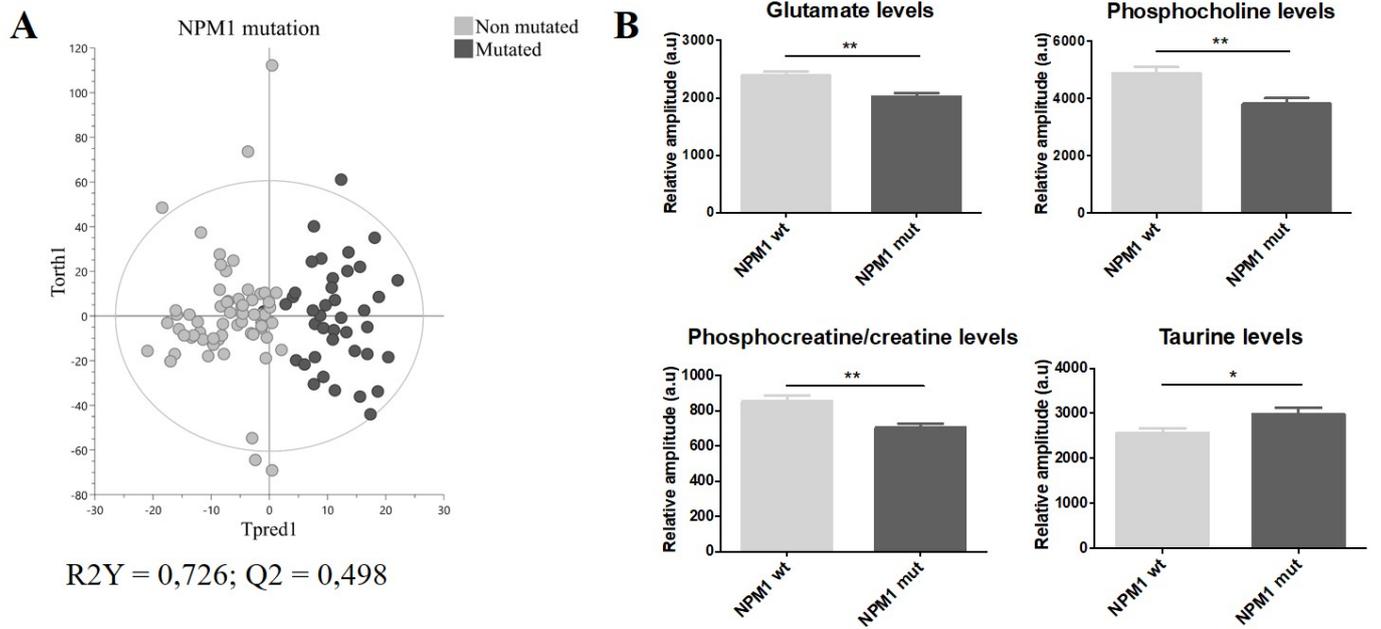


Figure 3

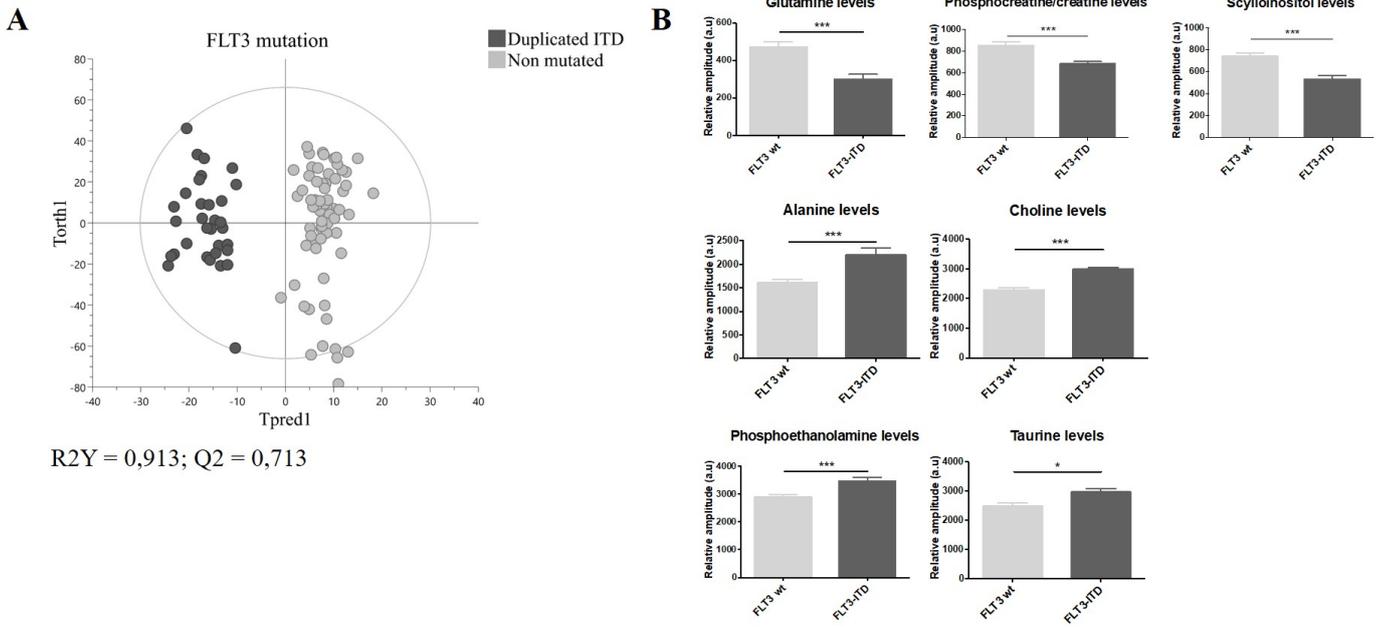


Figure 4

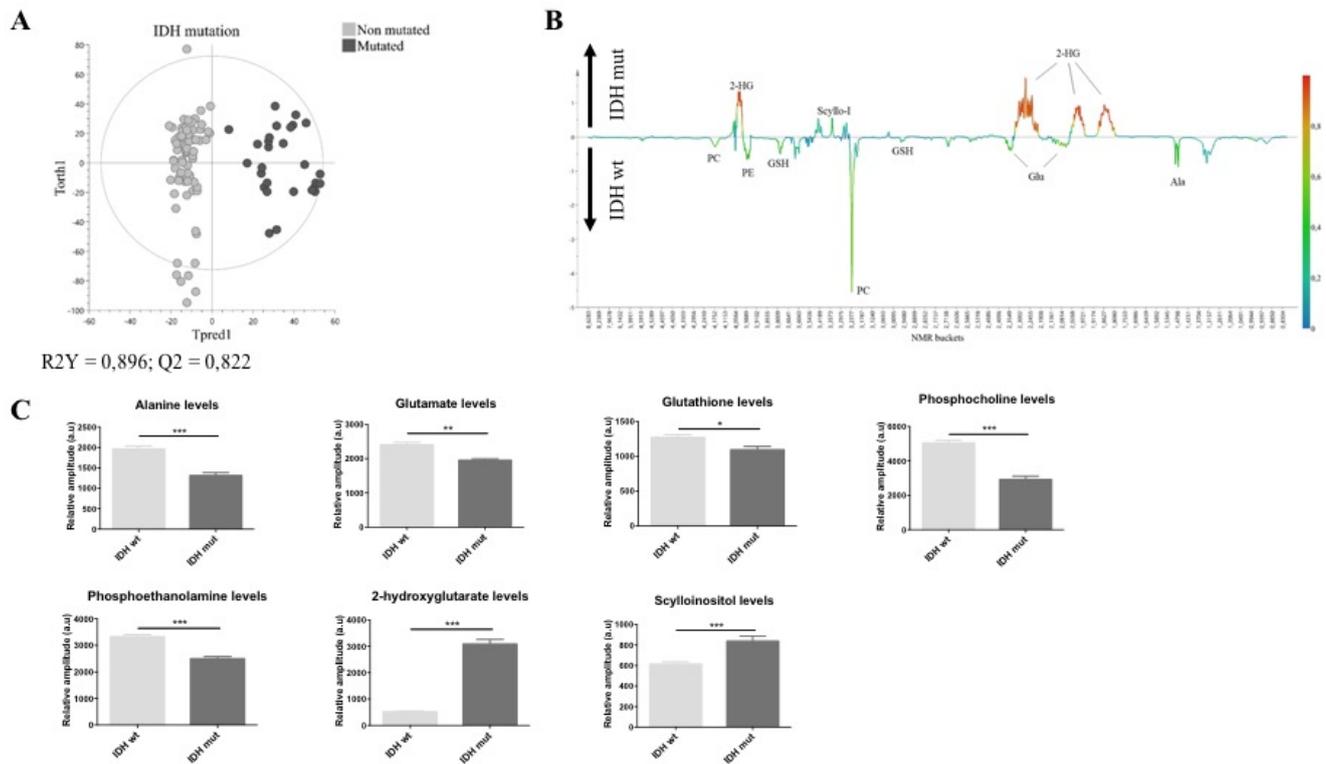


Figure 5

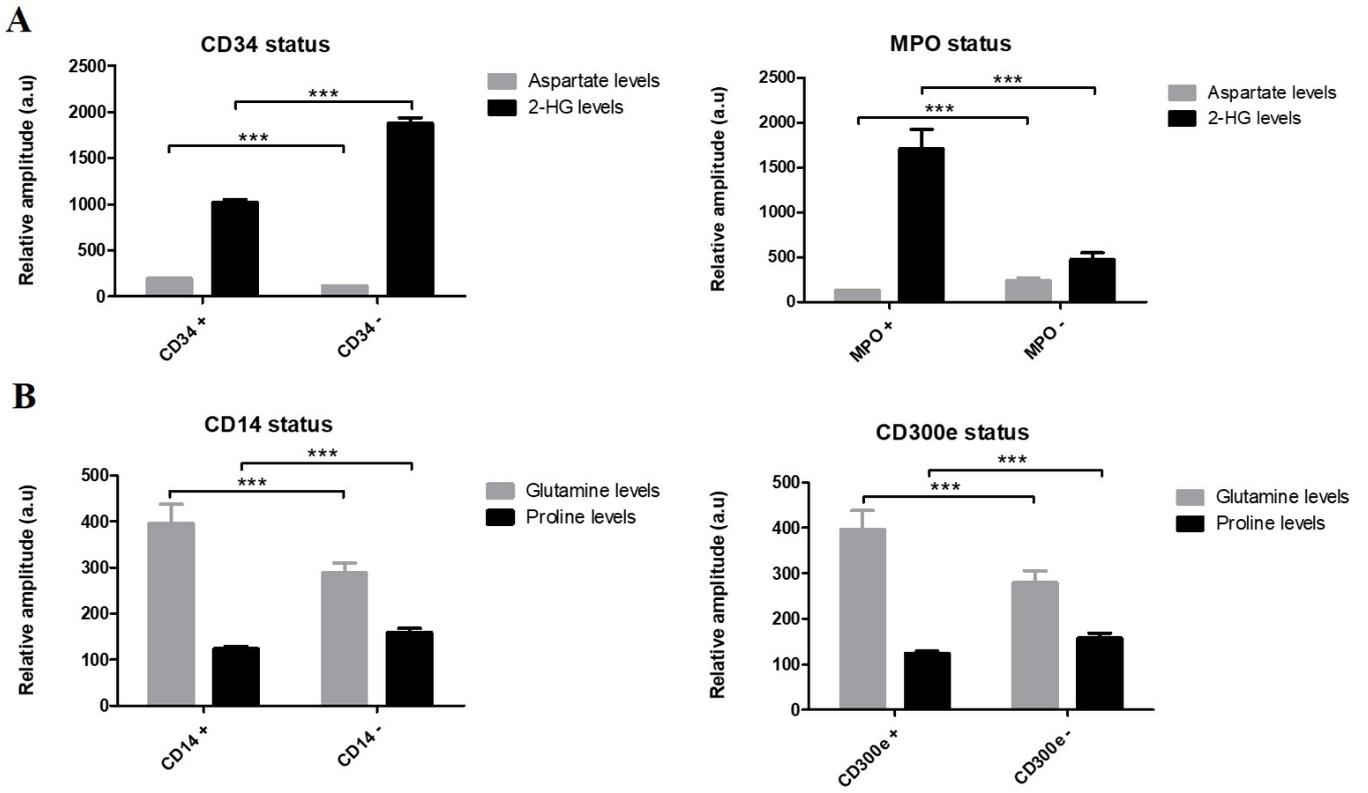


Figure 6

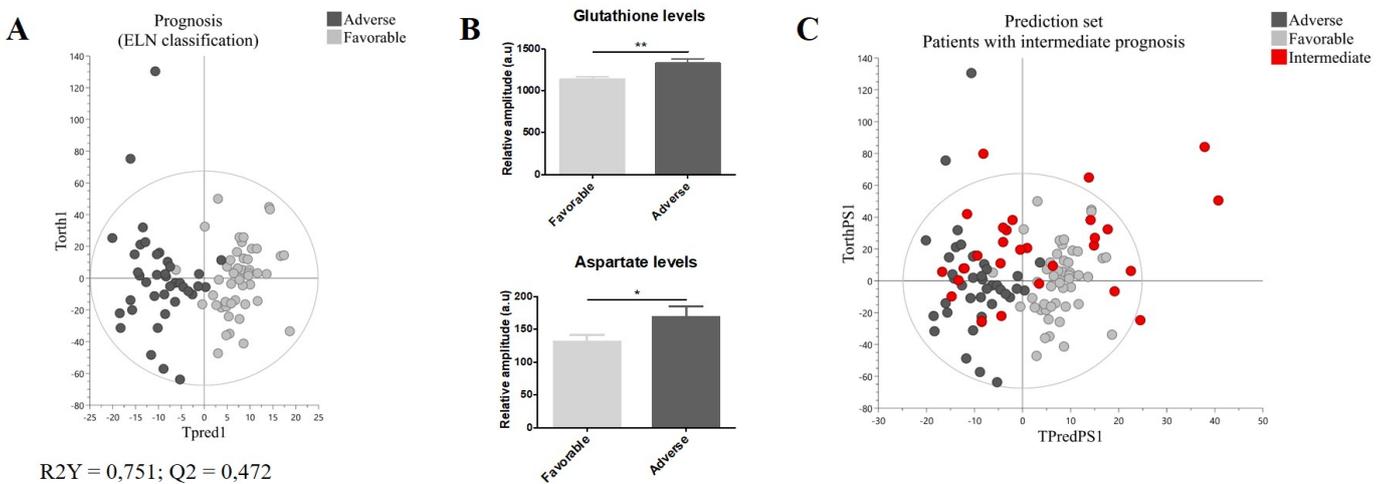
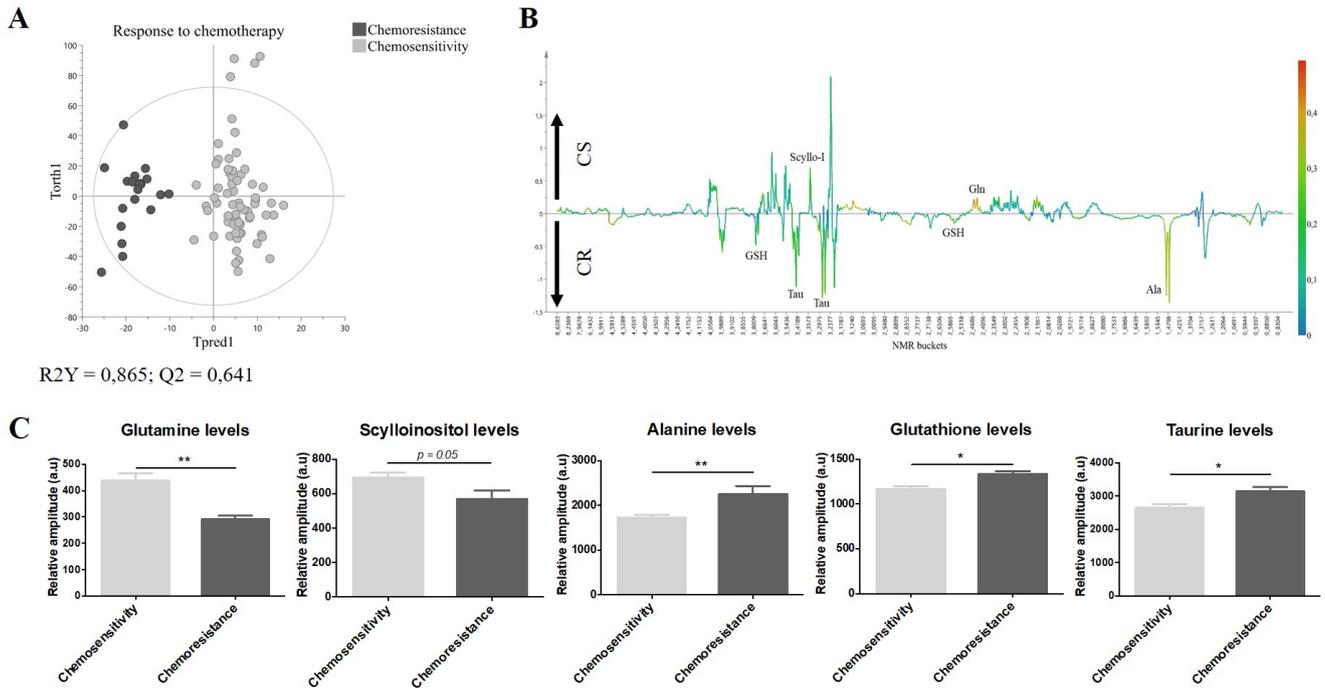


Figure 7



R2Y = 0,865; Q2 = 0,641

Supplemental file

Supplemental methods

Multivariate statistics

To evaluate the potential of metabolomics for prognosis in clinic (e.g. for intermediate cases), new data with no prior class assignment were projected into an OPLS-DA model, and their classification predicted. An exact Fisher test evaluated the significance of the predicted classification.

Univariate statistics

The sum of buckets for one isolated peak or a non-overlapping part of a peak for each identified metabolite was used for the univariate statistics. The amplitude of the most discriminant metabolites (correlation > 0.5 and peak with the smallest overlap possible) were used for t test or for two-way ANOVA analysis. Moreover, discriminatory cutoff values for 2-HG were evaluated to maximize sensitivity, specificity, and create an optimal threshold point for clinical purposes through receiver operating characteristic curve (ROC) analysis. Then, overall survival (OS) was calculated from the date of disease diagnosis until date of death. Survival curves were estimated by the Kaplan-Meier method and OS compared using the log rank test. OS was defined as the time from the date of diagnosis to the date of death due to any cause or at last follow-up. All the analyses were performed with the software Graph Pad Prism©.

Supplemental data

Table 1. Patient's characteristics at diagnosis of *de novo* AML.

Median age	62 [24 ; 88]
Sex ratio (M/W)	1.7
Leukocytosis	n (%)
< 4 10 ³ /μL	13 (24)
4-30 10 ³ /μL	24 (45)
30-100 10 ³ /μL	13 (24)
> 100 10 ³ /μL	4 (7)
AML subtype (FAB classification)	n (%)
M0	3 (6)
M1	12 (22)
M2	23 (43)
M4	8 (15)
M5	8 (15)
Bone marrow blasts	n (%)
20-40%	13 (24)
40-60%	14 (26)
60-80%	11 (20)
80-100%	16 (30)
Prognosis (ELN classification)	n (%)
Favorable	21 (39)
Intermediate	15 (28)
Adverse	18 (33)
Molecular status	n (%)
<i>NPM1</i>	17 (31)
<i>FLT3</i> -ITD	13 (24)
<i>IDH</i>	13 (24)
<i>TET2</i>	6 (11)
<i>CEBPA</i>	5 (9)
<i>RUNX1</i>	3 (6)
<i>TP53</i>	1 (2)
Response to chemotherapy	n (%)
Chemosensitive	31 (57)
Chemoresistant	7 (13)
NA	16 (30)

Table 2. Metabolites identified with HRMAS NMR analysis.

Metabolites (ID) and abbreviation	Chemical shift (ppm) and multiplicity	Buckets (ppm)
2-hydroxyglutarate (2-HG)	1.83 (m), 1.98(m), 2.25(m), 4.03(m)	1.8029-1.8952
Alanine (Ala)	1.48 (d)	1.4653-1.5012
Asparagine (Asn)	2.84 (m), 4.00(dd)	2.8685-2.8984
Aspartate (Asp)	2.66(dd), 2.80 (dd), 3.89(dd)	2.7890-2.8070
Choline (Cho)	3.20 (s)	3.2120-3.2232
Glutamate (Glu)	2.05(m), 2.13(m), 2.35 (m)	2.3190-2.3754
Glutamine (Gln)	2.13(m), 2.45 (m)	2.4216-2.4814
Glutathione (GSH)	2.15(m), 2.54 (m), 2.97(dd), 3.78(m)	2.5181-2.6070
Glycine (Gly)	3.56 (s)	3.5564-3.5667
Lactate (Lac)	1.31 (d), 4.10(q)	1.3200-1.3508
Myo-inositol (myo-I)	3.27(t), 3.53(dd), 3.62 (t), 4.05(t)	3.5958-3.6453
Phosphocholine (PC)	3.21 (s), 4.16(m)	3.2249-3.2411
Phosphocreatine/Creatine (PCr/Cr)	3.03 (s), 3.93(s)	3.0249-3.0480
Phosphoethanolamine (PE)	3.24(t), 4.01 (m)	3.9666-4.0000
Proline (Pro)	1.99(m), 2.06(m), 2.34(m), 3.33(dt), 3.41(dt), 4.12 (dd)	4.1188-4.1273
Scyllo-inositol (scyllo-I)	3.33 (s)	3.3402-3.3548
Taurine (Tau)	3.25(t), 3.42 (t)	3.4077-3.4411
Ascorbate (Asc)	4.52 (d)	4.5153-4.5358
Valine (Val)	0.98(d), 1.03 (d)	1.0329-1.0628

The chemical shifts are relative to the right peak of alanine doublet (1.475 ppm) and the peaks used for the univariate statistics are in bold (s singlet, d doublet, dd doublet of doublets, t triplet, q quadruplet, m multiplet). The buckets used in the univariate statistics are given for each metabolite we analyzed. Only non-overlapping resonances of metabolites are listed.

Table 3. Intracellular metabolites changes in AML patients according to their molecular statuses.

Metabolites (ID) and abbreviation	Changes in NPM1 ^{mut} vs NPM1 ^{wt}	Changes in FLT3 ^{ITD} vs FLT3 ^{wt}	Changes in IDH ^{mut} vs IDH ^{wt}
2-hydroxyglutarate (2-HG)	↑	=	↑
Alanine (Ala)	=	↑	↓
Asparagine (Asn)	↓	↓	=
Aspartate (Asp)	↓	↓	↓
Choline (Cho)	=	↑	↓
Glutamate (Glu)	↓	=	↓
Glutamine (Gln)	=	↓	↑
Glutathione (GSH)	=	=	↓
Glycine (Gly)	=	↑	=
Lactate (Lac)	=	=	=
Myo-inositol (myo-I)	=	↑	↓
Phosphocholine (PC)	↓	=	↓
Phosphocreatine/Creatine (PCr/Cr)	↓	↓	↑
Phosphoethanolamine (PE)	=	↑	↓
Proline (Pro)	=	=	↓
Scyllo-inositol (scyllo-I)	=	↓	↑
Taurine (Tau)	↑	↑	↑
Valine (Val)	=	=	↓

Supplemental figures

Figure S1

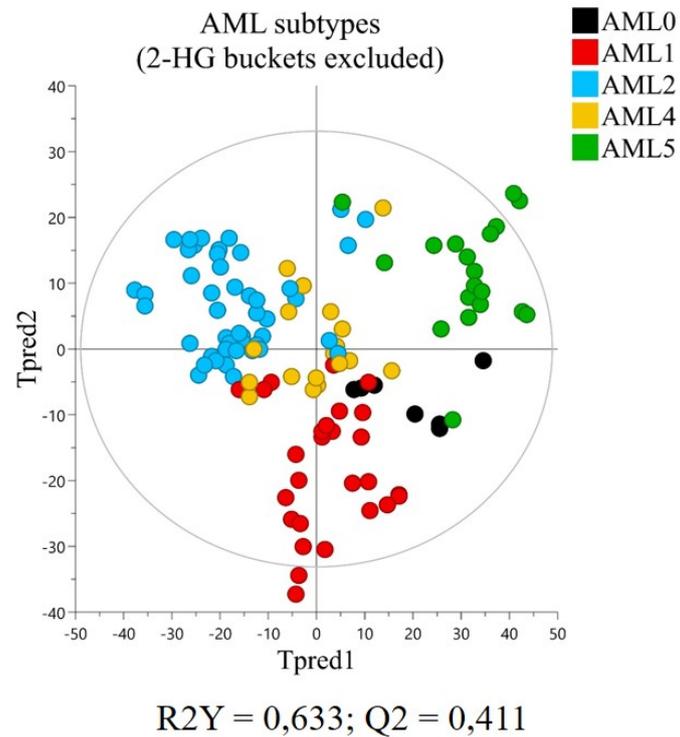


Figure S1. Specific metabolic profile of AML patients according to cellular differentiation of leukemic progenitors (FAB classification) without 2-HG buckets. Score plot of the OPLS-DA model for the different AML subtypes, excluding the buckets relative to the oncometabolite 2-hydroxyglutarate ($R^2Y = 0,663$; $Q^2 = 0,411$).

Figure S2

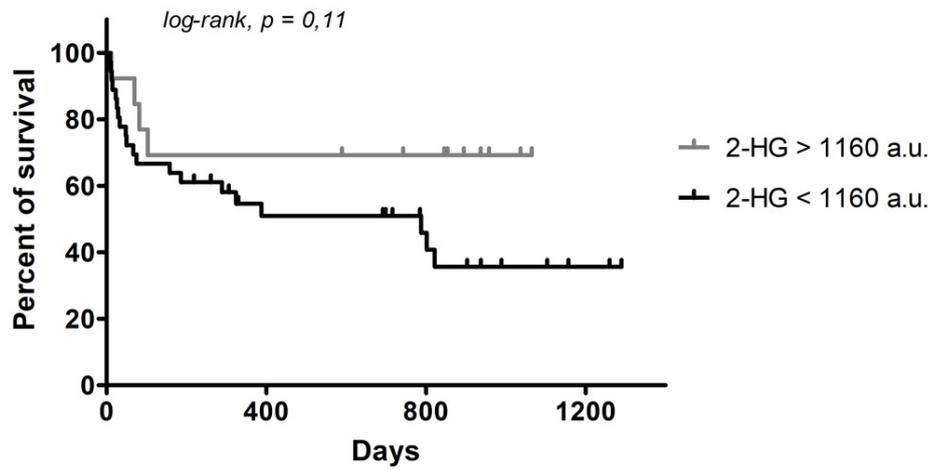


Figure S2. Impact of 2-HG level on survival. The Kaplan-Meier curve showing the overall survival (OS) for the patients with a level of 2-HG higher than 1160 arbitrary units (a.u., grey) compared with patients with a level of 2-HG lesser than 1160 a.u (black). The OS was evaluated by a log-rank test ($p = 0.11$).

Partie 3 : Exploration des pistes complémentaires à l'issue des analyses par RMN-HRMAS

1. Introduction et contexte

1.1. L'exploration du métabolisme des phospholipides

L'analyse des différentes lignées cellulaires de LAM par RMN-HRMAS a révélé des modifications du métabolisme phospholipidique à l'état basal ainsi qu'en condition de stress métabolique. Lors de l'adaptation métabolique des lignées à leur environnement sans sérum, toutes ont montré une surexpression de phosphocholine (PC) à 24h de culture dans ce milieu restrictif. Ces résultats suggérant un rôle clé du métabolisme des lipides dans la survie des cellules leucémiques, nous avons approfondi l'exploration des altérations de ce métabolisme dans les LAM. Nous avons tout d'abord évalué la quantité d'AG totaux présents dans chaque lignée à l'état basal. Puis en se basant sur ces résultats, nous avons sélectionné 2 lignées présentant des différences significatives de leur profil lipidomique, KG1 et K562, pour approfondir les analyses en conditions de privation en sérum. KG1 est l'une des 5 lignées à avoir la quantité d'AG la plus faible à l'état basal, tandis que K562 a la quantité la plus élevée. L'augmentation de PC pouvant être aussi bien une cause qu'une conséquence de l'adaptation métabolique des cellules, le but de l'analyse lipidomique sur les 2 lignées était donc de connaître le sens (synthèse ou dégradation) de la réaction pour ce métabolite et ses intermédiaires dont la phosphatidyl-choline ((P)C). Parallèlement, nous voulions explorer les caractéristiques lipidomiques générales de nos patients, en analysant les plasmas congelés au moment du diagnostic. Nous avons évalué la quantité totale d'AG et de

lipides présents dans les plasmas, et comparé les caractéristiques des patients de pronostic favorable *versus* défavorable, pour comprendre l'impact du lipidome sur l'évolution de la pathologie chez les patients.

1.2. L'exploration du métabolisme des acides aminés : exemple de l'alanine

Toujours en se basant sur notre analyse par RMN-HRMAS, nous nous sommes également intéressés au niveau d'alanine dans deux lignées cellulaires : KG1 et K562. En effet, KG1 présente des niveaux très faibles d'alanine contrairement à K562 qui est la lignée qui exprime le plus ce métabolite à l'état basal. D'après de précédents travaux sur des cellules gliales, il semblerait que les niveaux d'alanine (ainsi que plusieurs autres acides aminés non-essentiels) soient régulés au niveau métabolique par un gène suppresseur de tumeur : *LKB1* (aussi appelé *STK11*). En plus de cette dérégulation d'alanine, il semblerait que l'axe *LKB1/AMPK* entraîne une inhibition de la voie de signalisation *mTOR*¹⁴³. Dans un premier temps, nous avons dosé la quantité d'alanine présente dans ces deux lignées cellulaires (KG1 et K562), à l'état basal, en conditions de privation en sérum, et en conditions de privation en glucose. Dans un second temps, nous avons recherché par Western Blot la présence ou non de *LKB1* dans nos 2 lignées cellulaires, et nous avons vérifié l'activité de *LKB1* en étudiant la phosphorylation de plusieurs substrats de *LKB1* et de *mTOR*, dont *AMPK* et *S6RP* (*S6 Ribosomal Protein*) respectivement.

2. Matériels et méthodes

2.1. Analyse lipidomique

2.1.1. *Extraction des lipides totaux et dérivatisation des métabolites*

Les cellules des 5 lignées cellulaires (HEL, HL60, KG1, K562, OCI-AML3) ont été collectées dans des tubes Eppendorf® ($1 \cdot 10^7$ cellules par réplicat, $n = 4$) après quenching du métabolisme dans un bain d'éthanol pur (99,6%) avec ajout de carboglace dans le but de stopper rapidement le métabolisme. Concernant les plasmas de patients, ils ont été décongelés à température ambiante et aliquotés à raison de 50 μ L par échantillon de patient. Dans des vials (petits tubes en verre appropriés pour l'analyse des lipides), les lipides totaux ont été extraits dans un mélange de chloroforme/méthanol/eau (2:1:0,8 v/v/v), contenant 10 nmol de standard interne C13:0 (FFA – Free Fatty Acids) et C21:0 ((P)C – Phosphatidylcholine), pendant 1 heure à 4°C avec des périodes de sonication pour dissoudre correctement l'échantillon. A la fin de l'extraction, les métabolites polaires et apolaires ont été séparés par séparation de phase.

Afin d'analyser les échantillons lipidiques par GC-MS, les AG des échantillons doivent être dérivatisés, c'est-à-dire méthanolysés pour donner des esters méthyliques d'AG (FAME), qui sont plus faciles à vaporiser et qui peuvent être analysés par GC-MS.

Concernant les métabolites apolaires, la phase organique de chaque échantillon a été séchée sous gaz N₂, puis dissoute dans un mélange chloroforme/méthanol (2:1 v/v). 1 nmol de standard interne C15:0 (acide pentadécanoïque) a été ajouté au

mélange, puis chaque échantillon a été dérivatisé en utilisant 7 μL de MethPrep II (Alltech). Les FAME ainsi obtenus ont ensuite été analysés par GC-MS.

Pour les métabolites polaires, chaque échantillon dissout dans du 1-butanol a été homogénéisé par sonication et vortex. 1 nmol de standard interne C15:0 a été ajouté à l'échantillon, et les vials ont été séchés sous gaz N_2 . Chaque échantillon a été dérivatisé par méthanolyse, par ajout de toluène puis d'HCl méthanolique pendant 5 heures à 85°C . Les FAME ont ensuite été extraits à l'aide d'un mélange hexane/eau (1:0,4 v/v) puis transféré dans d'autres vials afin d'être analysés par GC-MS.

Enfin, dans chaque échantillon préparé pour analyser le cholestérol total, 1 nmol de standard interne C15:0 a été ajouté. Les vials ont été séchés sous gaz N_2 , et l'échantillon dérivatisé par triméthylsilylation (TMS) dans 30 μL de BSTFA-TCMS (99:1), avant d'être analysés par GC-MS.

2.1.2. Analyse des différentes espèces lipidiques

Pour déterminer la nature de chaque espèce lipidique présente dans chaque lignée cellulaire et les quantifier, nous avons utilisé une technique de HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography) en 2 dimensions, sur plaque de silice. Quatre réplicats biologiques par lignée cellulaire ont été analysés. Entre 2,5 et 5 μL d'échantillon (selon la lignée étudiée) ont été déposés dans le coin inférieur gauche de la plaque de silice (10x10 cm), à 1 cm des bords de la plaque. Après séchage à l'air libre, la migration de la plaque de silice contenant l'échantillon s'est faite en deux temps. La première migration s'est faite dans un mélange chloroforme/méthanol/28% NH_4OH (60:35:8 v/v/v). Après séchage et retournement de la plaque à 90° , la

deuxième migration s'est faite dans un mélange chloroforme/acétone/méthanol/acide acétique/eau (50:20:10:13:5 v/v/v/v/v). Concernant les plasmas de patients, la TLC s'est faite à une dimension dans deux solvants différents. 3 µL par échantillon de patient étudié ont été déposés sur la plaque de silice. La première migration dans un mélange chloroforme/méthanol/eau/acide acétique (25:15:2:4 v/v/v/v) permet de visualiser les phospholipides et la deuxième migration dans un mélange hexane/diéthyléther/acide formique (40:10:1 v/v/v) permet de visualiser les lipides neutres (cholestéryl esters, triglycérides et acides gras). Après séchage, les lipides ont été visualisés sous lampe UV après pulvérisation de pulimurine. Les différents spots lipidiques ont été entourés, puis grattés à l'aide d'un scalpel et enfin transférés dans des vials. Les échantillons ont ensuite été dérivatisés par méthanolyse, comme décrit précédemment, et les FAME extraits avant d'être analysés par GC-MS.

L'analyse par GC-MS a été réalisée sur un système Agilent 5977A-7890B. Une injection sans division (10:1, température d'injection 250°C) sur un DB-5MS de 30 m × 0,25 mm a été utilisée, en utilisant de l'hélium comme gaz vecteur. La température initiale du four était de 80°C (1 min), suivie de gradients de température à 140°C à 30°C/min (maintenus pendant 2 min), puis à 250°C à 5°C/min et à 320°C à 35°C/min et maintenu à 320°C pendant 5 min. Les FAME ont été identifiés par comparaison de leur temps de rétention et de leur spectre de masse d'après les données GC-MS grâce à des standards authentiques. Ils ont été normalisés sur le nombre de cellules et l'efficacité de l'extraction, puis ont été quantifiés à l'aide du logiciel de quantification Masshunter (Agilent). Les analyses statistiques ont été conduites avec GraphPad Prism, Les tests de Student ayant rendu $p < 0,05$ ont été considérés comme significatifs.

2.2. Analyse de la voie LKB1/AMPK impliquant l'alanine

2.2.1. *Culture cellulaire*

Les cellules ont été cultivées dans des milieux différents représentant les différentes conditions testées. Pour la condition basale, ou non traitée (NT), les cellules ont été cultivées à une densité de 5×10^5 cellules/mL dans un milieu contenant du RPMI 1640, du Sérum de Veau Fœtal (SVF) 10%, de la L-glutamine 1% et un mélange de Pénicilline/streptomycine (PS) 1%. Pour la condition de starvation en sérum (SS), les cellules ont été cultivées à une densité de 5×10^5 cellules/mL dans un milieu contenant du RPMI 1640, de la L-glutamine 1%, de la P/S 1% et de l'insuline-transferrine-sélénium (ITS) 1%. Enfin, pour la condition de starvation en glucose (GS), les cellules ont été cultivées à une densité de 5×10^5 cellules/mL dans un milieu contenant du RPMI 1640 sans glucose, 10% de SVF, 1% de L-glutamine, 1% de P/S, ainsi que des concentrations croissantes de 2-déoxyglucose (2-DG) : 1 mM, 2 mM et 5 mM. Le 2-DG permet l'inhibition énergétique par un glucose non métabolisable. Quelle que soit la condition testée, les cellules ont été placées à l'étuve à 37°C + 5% de CO₂ pendant 24 heures. Les cellules ont ensuite été centrifugées au bout de 24 heures puis congelées sous forme de culots secs à -80°C.

2.2.2. *Dosage d'alanine*

Pour réaliser les dosages d'alanine, nous avons utilisé un kit commercialisé (référence #K652-100, Biovision, USA). L'alanine est convertie en pyruvate qui est

spécifiquement détecté, entraînant une intensité de couleur proportionnelle à la concentration présente ($\lambda = 570 \text{ nm}$: 0-10 nmol). Pour chaque test, 1 million de cellules de chaque condition (NT, SS et GS + 2-DG 2 mM) a été utilisé, en triplicat.

2.2.3. *Western blot*

Les Western blots ont été réalisés avec les cellules cultivées pendant 24h dans toutes les conditions précédemment décrites (NT, SS, GS + 1, 2 ou 5 mM). Les cellules ont été lysées au bout de 24h dans leurs milieux de culture respectifs, et les protéines récupérées ont été dosées par micro Bradford. Les Western blots ont été réalisés en utilisant un protocole standard. Pour chaque échantillon testé, 20 μg d'échantillon ont été déposés dans le gel préalablement coulé. Après transfert, les membranes de nitrocellulose ont été incubées avec des anticorps primaires pendant une nuit à 4°C, puis 1h à température ambiante avec des anticorps secondaires. La β -actine a été utilisée comme contrôle de charge. Pour la quantification des protéines, nous avons utilisé le logiciel ImageJ.

3. Résultats

3.1. Modifications du métabolisme lipidique et phospholipidique

3.1.1. *Quantification des acides gras totaux*

La quantification globale des acides gras totaux dans les 5 lignées cellulaires cultivées en conditions basales montre une prédominance significative d'AG (glycérolipides, acides gras libres) dans la lignée K562 par rapport aux 4 autres lignées ($p < 0,0001$) avec une moyenne de $934,1 \text{ nmol}/10^7$ cellules. HEL contient en moyenne $423,3 \text{ nmol}$ d'AG/ 10^7 cellules, viennent ensuite les cellules OCI-AML3, avec une moyenne de $302,2 \text{ nmol}/10^7$ cellules, puis KG1 avec $234,9 \text{ nmol}/10^7$ cellules. Enfin, HL60 est la lignée dans laquelle on en retrouve le moins ($136 \text{ nmol}/10^7$ cellules). (Figure 16).

Quantité d'acides gras totale (glycérolipides, acides gras libres) normalisée sur la PC-C21:0

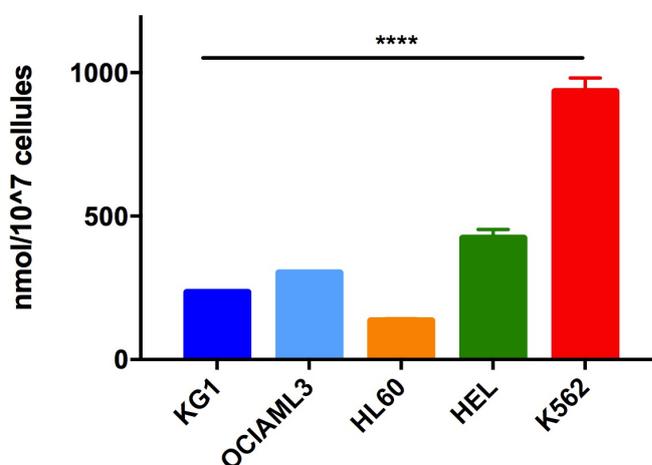


Figure 16. Quantification des acides gras totaux dans les cinq lignées cellulaires à l'état basal.

**** $p < 0,0001$

Pour rester cohérent avec la suite des analyses, nous avons choisi de comparer les lignées K562 et KG1 dans la suite des expériences. La quantité d'AG totaux se révèle très différente entre les deux lignées (**Figure 17A**, $p < 0,0001$). La composition détaillée des différents AG est donnée dans la Figure 16B pour Les deux lignées à l'état basal. On note des différences significatives pour tous les types d'AG ($p < 0,001$), sauf pour C14:0 (acide myristique), C18:2 (acide linoléique), C20:4 (acide arachidonique) et C22:6 (acide docosahexaénoïque ou DHA) (**Figure 17B**).

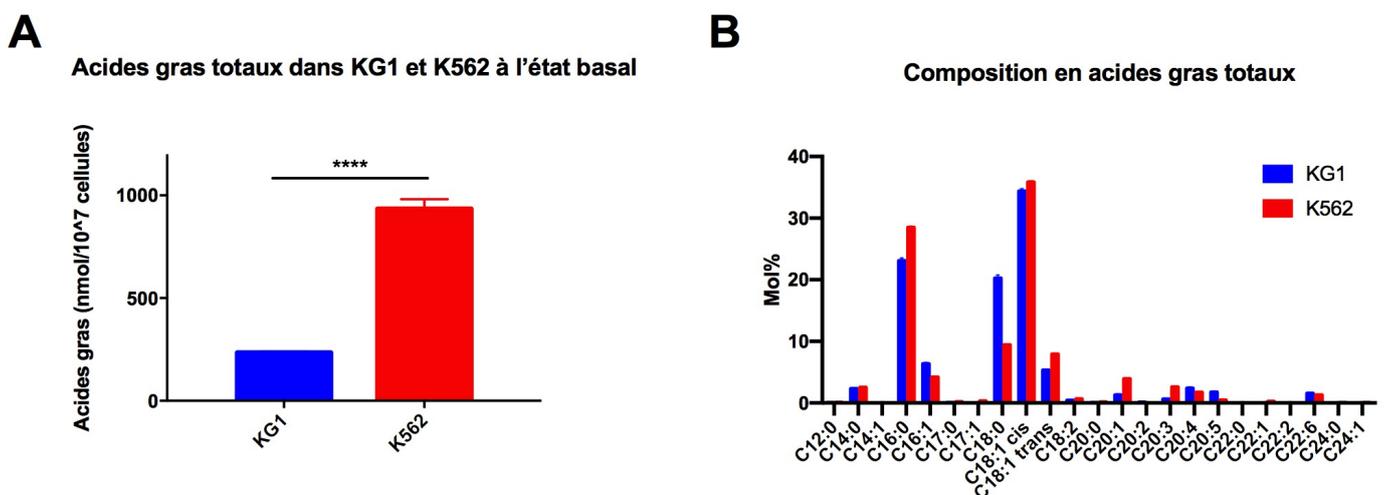


Figure 17. A. Quantité d'acides gras totaux dans les lignées KG1 et K562 à l'état basal. **B.** Composition en acides gras totaux dans les lignées KG1 et K562 à l'état basal. **** $p < 0,0001$.

En conditions de starvation en sérum, les mêmes phénomènes sont observés dans les deux lignées cellulaires après l'extraction des AG totaux. La quantité totale d'AG est significativement diminuée dans les deux lignées en starvation par rapport à leur état basal (**Figure 18A, C**). Concernant la composition en AG, nous constatons d'une part une augmentation de la quantité d'acide palmitoléique (C16:1) en starvation par rapport à l'état basal ($p < 0,001$). D'autre part, nous observons une diminution de la

quantité d'acide stéarique (C18:0) ($p < 0,001$) ainsi que des PUFA (acide gras polyinsaturés) suivant : DGLA ou acide dihomogamma-linolénique (C20:3), acide arachidonique (C20:4), EPA ou acide eicosapentaénoïque (C20:5) et DHA (C22:6) en starvation ($p < 0,001$) (**Figure 18B, D**).

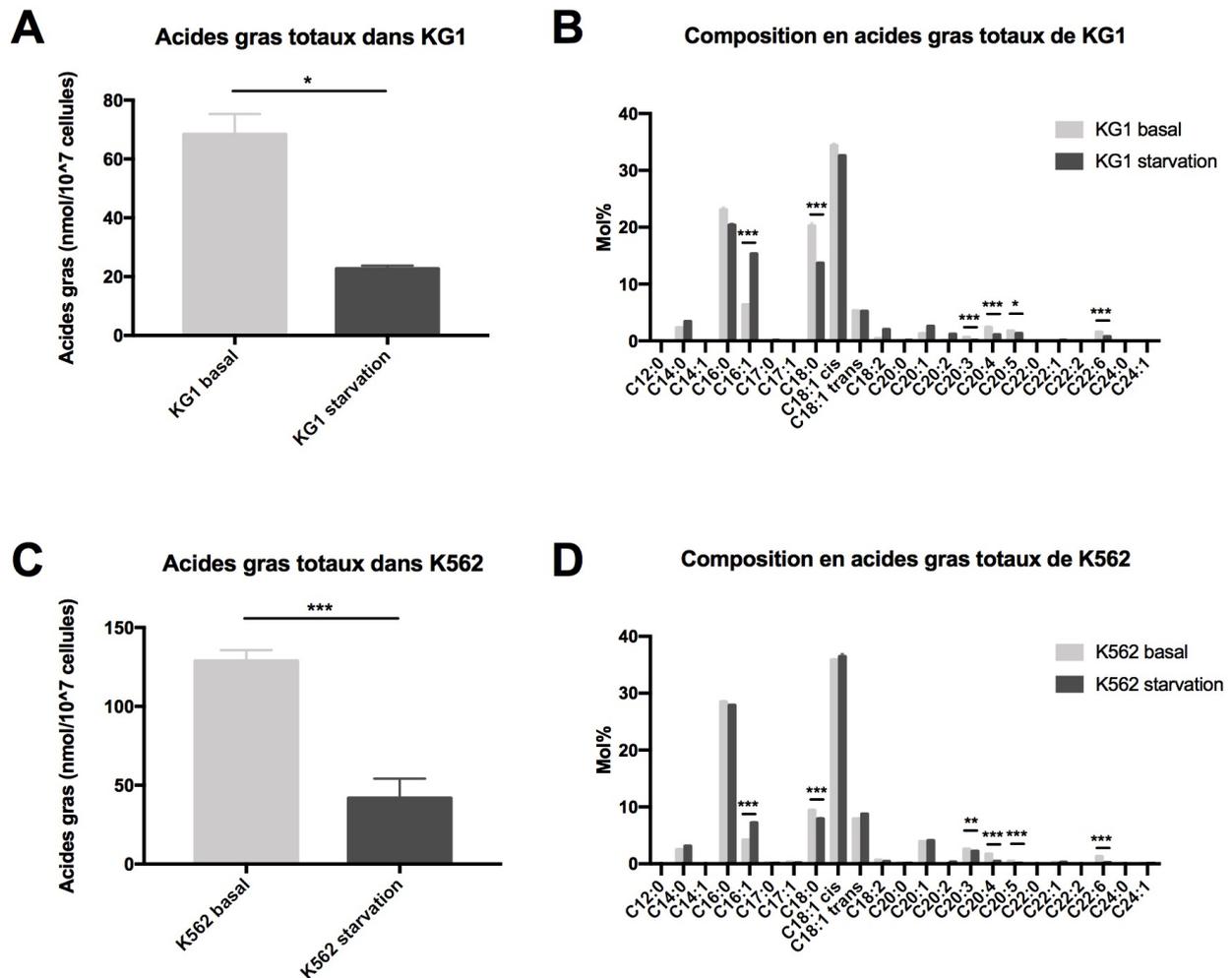


Figure 18. **A.** Quantité d'acides gras totaux dans KG1 basal *versus* starvation. **B.** Composition en acides gras totaux dans KG1 basal *versus* starvation. **C.** Quantité d'acides gras totaux dans K562 basal *versus* starvation. **D.** Composition en acides gras totaux dans K562 basal *versus* starvation. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

3.1.2. Quantification des espèces lipidiques dans les lignées KG1 et K562

A l'état basal, la composition en espèces lipidiques des lignées KG1 et K562 se révèle très différente. De nombreuses espèces lipidiques ont été retrouvées dans les deux lignées (> 10). Les principales différences observées sont une augmentation de (P)C ($p < 0,05$), de phosphatidyl-éthanolamine ((P)E) ($p < 0,01$), du mélange triacylglycérol/cholestéryl ester (TAG/CE) ($p < 0,05$) et de cardioline (CL) ($p < 0,001$) dans la lignée K562 par rapport à KG1 (**Figure 19**).

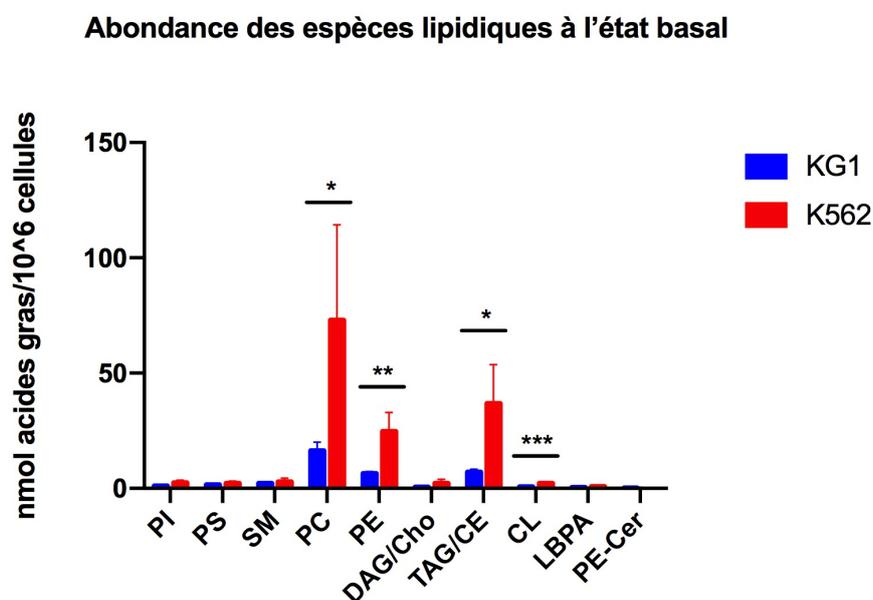


Figure 19. Quantification des espèces lipidiques dans les lignées KG1 et K562 en conditions basales. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

PI : phosphatidyl-inositol, *PS* : phosphatidyl-sérine, *SM* : sphingomyéline, *PC* : phosphatidyl-choline, *PE* : phosphatidyl-éthanolamine, *DAG* : diacylglycérol, *Cho* : cholestérol, *TAG* : triacylglycérol, *CE* : cholestéryl-ester, *CL* : cardioline, *LBPA* : acide lysobisphosphatidique, *Cer* : céramide.

En conditions de starvation, on observe dans KG1 tout d'abord une diminution de phosphatidyl-sérine (PS, $p < 0,01$), sphingomyéline (SM, $p < 0,05$), (P)C ($p < 0,05$), CL ($p < 0,001$) et PE-Ceramide ($p < 0,05$) par rapport aux conditions basales (**Figure 20**). Concernant la lignée K562, on observe en starvation une diminution de SM ($p = 0,07$), (P)C ($p < 0,05$), (P)E ($p < 0,01$), du mélange TAG/CE ($p < 0,05$), CL ($p < 0,001$) et d'acide lysobiphosphatidique (LBPA, $p < 0,05$) (**Figure 21**). Les phénomènes communs aux deux lignées sont la diminution de (P)C, SM et de CL en starvation par rapport aux conditions basales.

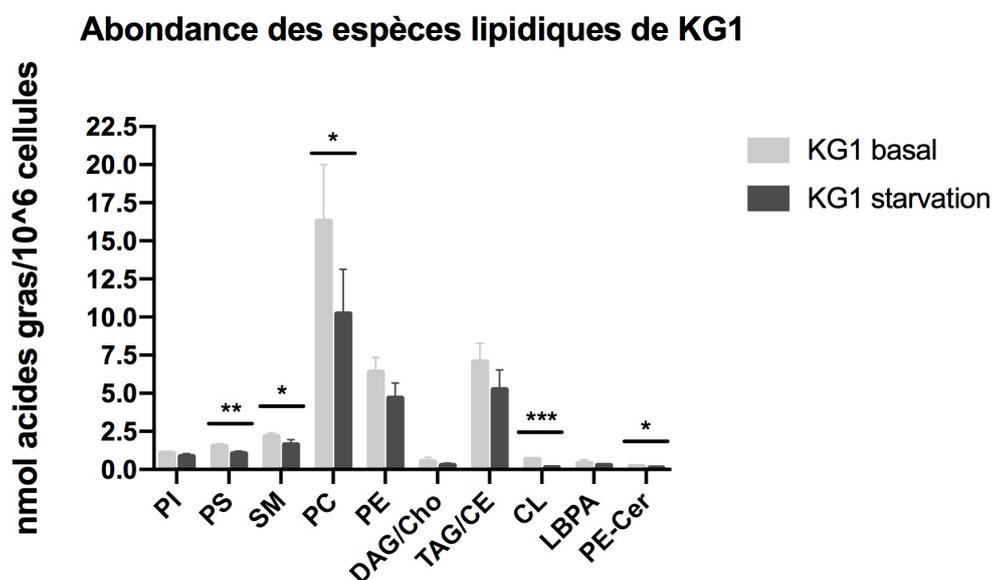


Figure 20. Quantification des espèces lipidiques dans la lignée KG1 en conditions basales *versus* starvation. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

PI : phosphatidyl-inositol, *PS* : phosphatidyl-sérine, *SM* : sphingomyéline, *PC* : phosphatidyl-choline, *PE* : phosphatidyl-éthanolamine, *DAG* : diacylglycérol, *Cho* : cholestérol, *TAG* : triacylglycérol, *CE* : cholestéryl-ester, *CL* : cardiolipine, *LBPA* : acide lysobisphosphatidique, *Cer* : céramide.

Abondance des espèces lipidiques de K562

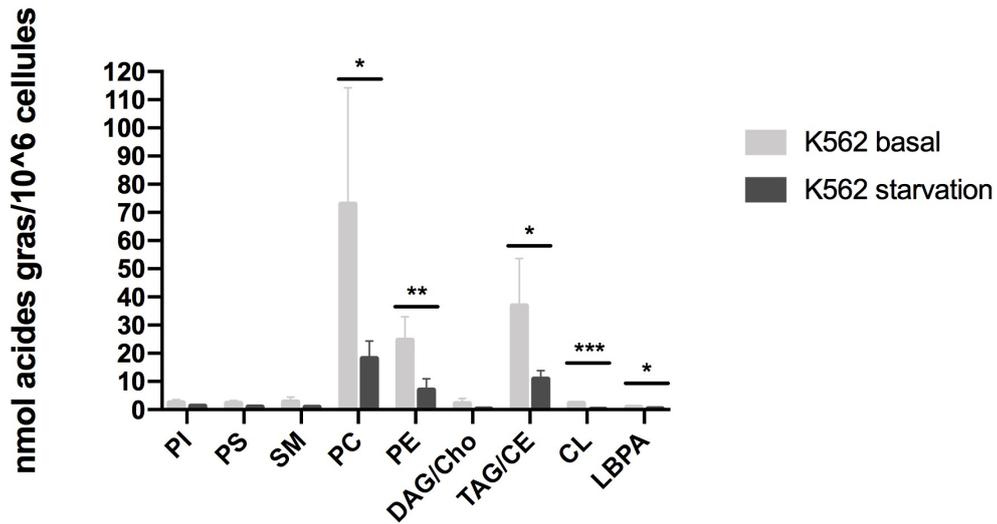


Figure 21. Quantification des espèces lipidiques dans la lignée K562 en conditions basales *versus* starvation. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

PI : phosphatidyl-inositol, *PS* : phosphatidyl-sérine, *SM* : sphingomyéline, *PC* : phosphatidyl-choline, *PE* : phosphatidyl-éthanolamine, *DAG* : diacylglycérol, *Cho* : cholestérol, *TAG* : triacylglycérol, *CE* : cholestéry-ester, *CL* : cardiolipine, *LBPA* : acide lysobisphosphatidique.

3.1.3. Analyses des plasmas de patients

Dans un premier temps, nous avons analysés la composition en AG totaux dans les plasmas des patients de pronostic favorable ($n = 21$) *versus* défavorable ($n = 18$). D'après l'analyse statistique, aucune différence significative n'est observée de premier abord entre les deux groupes de patients concernant la teneur en AG totaux (**Figure 22A**) et la composition détaillée de ces AG (**Figure 22B**).

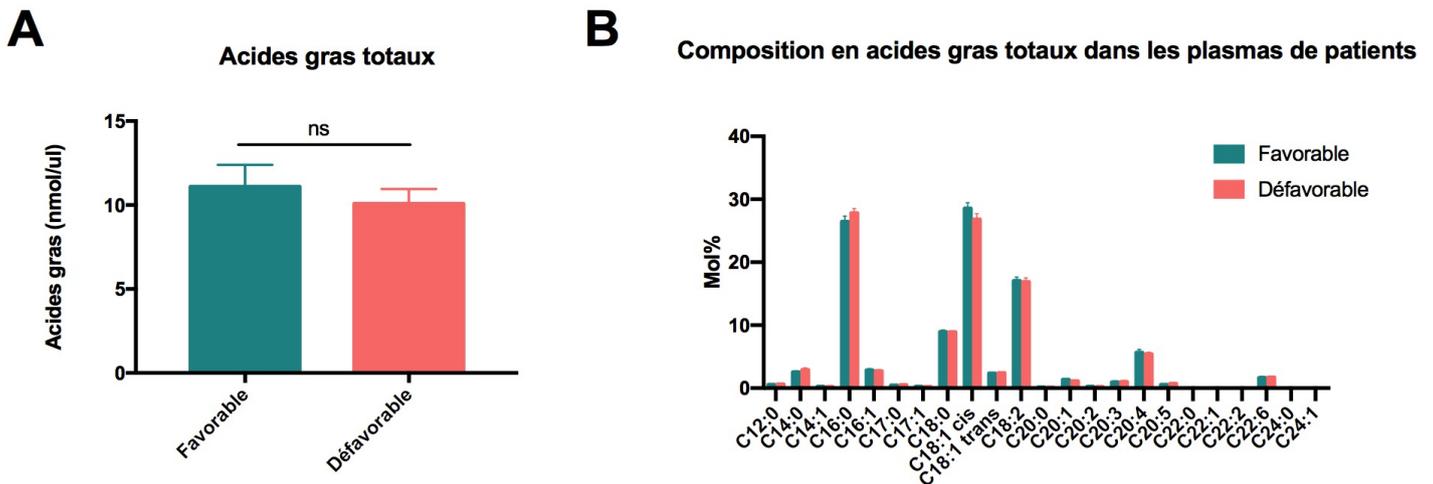


Figure 22. A. Quantité d'acides gras totaux dans les plasmas des patients de pronostic favorable *versus* défavorable. **B.** Composition en acides gras totaux dans les plasmas de patients de pronostic favorable *versus* défavorable.

Pour aller plus loin, nous avons comparé la composition détaillée des espèces lipidiques de 5 patients de chaque groupe. Nous avons pu identifier 8 composés chez les 10 patients. D'une part, la sphingomyéline (SM), la phosphatidyl-choline ((P)C), le phosphatidyl-inositol (PI) et la phosphatidyl-éthanolamine ((P)E), qui correspondent aux phospholipides (PL), sont apparus après la première migration. D'autre part, un mélange de diacylglycérol et cholestérol (DAG-Cho), des acides gras libres (FFA), le triacylglycérol (TAG), les cholestéryl-esters (CE), qui correspondent aux lipides neutres (LN), sont apparus après la seconde migration. Après analyse de chaque spot lipidique, on observe une augmentation significative de SM ($p < 0,05$), PI ($p < 0,01$), et FFA ($p < 0,01$) dans les plasmas de patients ayant un pronostic défavorable (**Figure 23**).

Abondance des espèces lipidiques dans les plasmas de patients

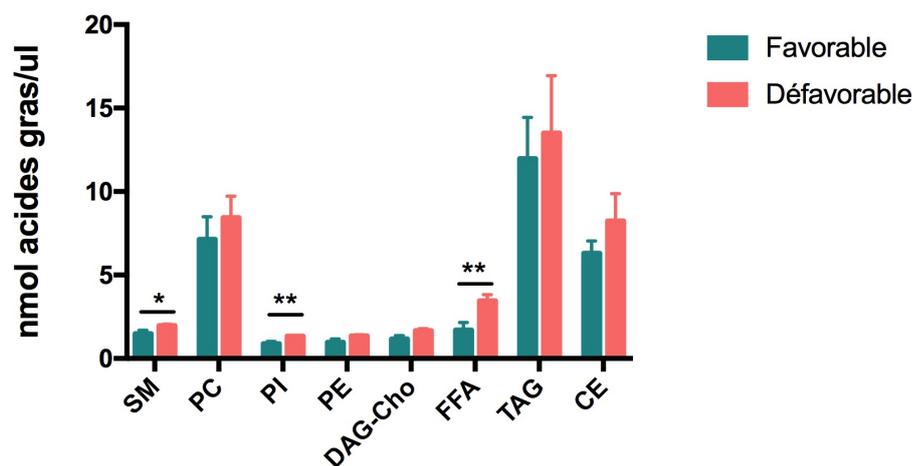


Figure 23. Quantification des espèces lipidiques dans les plasmas de patients de pronostic favorable (n = 5) et défavorable (n = 5). * p < 0,05 ; ** p < 0,01.

SM : sphingomyéline, PC : phosphocholine, PI : phosphatidyl-inositol, PE : phosphoéthanolamine, DAG : diacylglycérol, Cho : cholestérol, FFA : Free Fatty Acids, TAG : triacylglycérol, CE : cholestéryl-ester.

Enfin, lorsque l'on regarde la teneur en PL et LN totaux dans les deux groupes de patients, on n'observe pas de différence majeure (respectivement p = 0,28 et p = 0,20) entre les patients de pronostic favorable et défavorable (**Figure 24A et B**). Cependant, l'étude approfondie de la composition en AG des spots lipidiques correspondants aux PL (SM (A), (P)C (B), PI (C) et (P)E (D)), met en évidence quelques différences significatives, et notamment une augmentation de C18:1 (cis) et de C20:1 dans les plasmas de patients de pronostic défavorable (**Figure 25**).

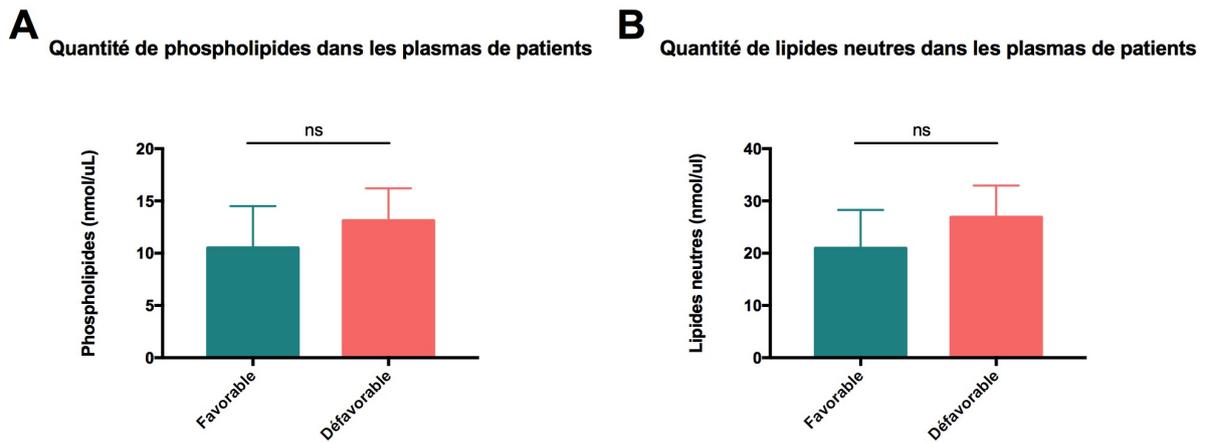


Figure 24. Quantité de phospholipides (**A**) et de lipides neutres (**B**) dans les plasmas des patients de pronostic favorable (n = 5) versus défavorable (n = 5).

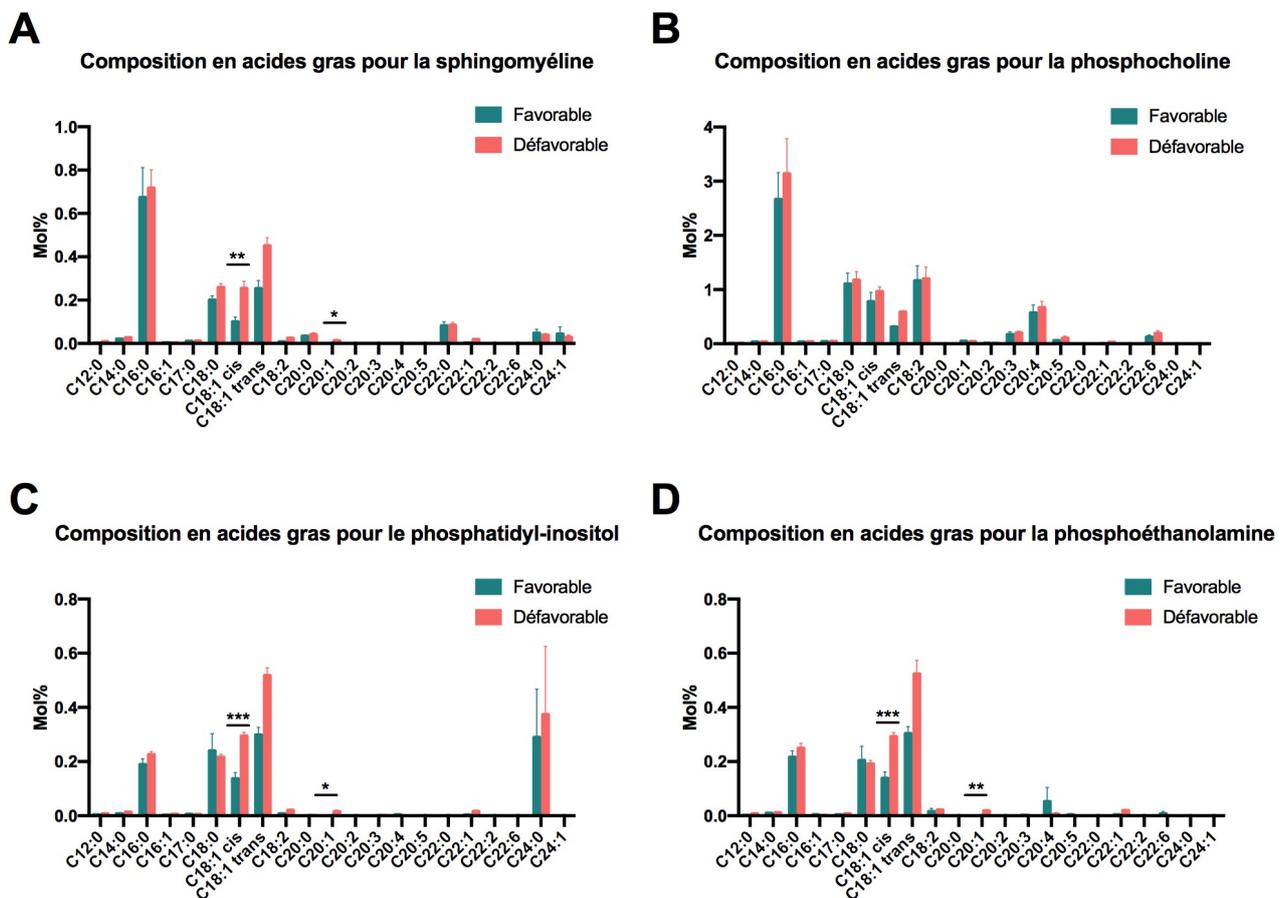


Figure 25. Composition en acides gras pour les spots lipidiques correspondants aux phospholipides. **A.** Sphingomyéline; **B.** Phosphatidyl-choline; **C.** Phosphatidyl-inositol; **D.** Phosphatidyl-éthanolamine. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.2. Modifications de l'alanine impliquant la voie LKB1/AMPK

3.2.1. Dosage d'alanine

Les dosages d'alanine effectués sur les lignées K562 (**Figure 26A**, n = 2) et KG1 (**Figure 26B**, n = 4) dans les 3 conditions précédemment décrites révèlent une concentration d'alanine plus élevée à l'état basal (NT) dans les deux lignées. En condition de stress métabolique, dans la lignée K562, le niveau d'alanine diminue dans le milieu dépourvu de glucose (GS) par rapport à l'état basal ($p < 0,05$). Dans la lignée KG1, les niveaux d'alanine diminuent dans le milieu dépourvu de sérum (SS) par rapport à l'état basal ($p < 0,01$) et dans le milieu dépourvu de glucose par rapport à l'état basal ($p < 0,0001$) et à l'état de privation en sérum ($p < 0,01$).

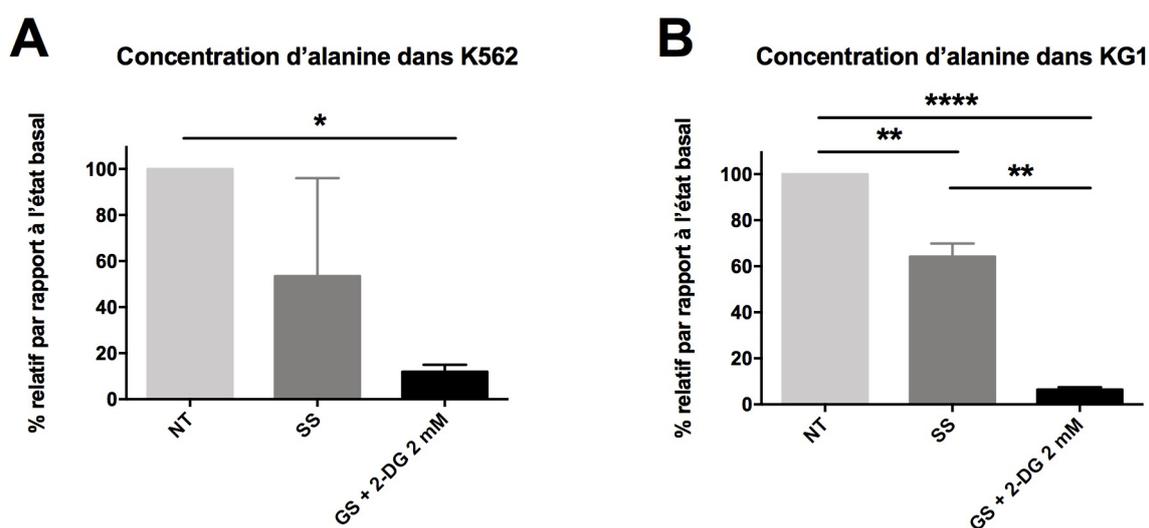


Figure 26. Concentration d'alanine dans les lignées K562 (**A**) et KG1 (**B**) dans les conditions basales (NT), de privation en sérum (SS) et de privation en glucose avec ajout de 2-déoxyglucose (GS + 2-DG). La concentration est représentée en pourcentage relatif par rapport à celle de l'état basal. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

3.2.2. Étude de l'activation de LKB1

Les conditions de stress métaboliques (SS et GS) montrent une diminution des niveaux d'alanine dans les deux lignées étudiées qui peut suggérer un lien potentiel entre le métabolisme de l'alanine et la voie LKB1. L'objectif de réalisation des western blot était donc d'une part de vérifier la présence de LKB1 dans les lignées cellulaires et d'autre part de vérifier son activation en étudiant un de ses principaux substrats : AMPK, ainsi qu'un autre substrat, la S6RP, qui reflète l'activation de la voie mTOR. Les résultats montrent une activation de LKB1 par la présence d'AMPK phosphorylé (P-AMPK) en condition de stress mais avec des réponses différentes entre les deux lignées cellulaires (n = 2) et selon le type de stress. Le rapport P-AMPK/AMPK total montre ainsi une activation de LKB1 plus élevée dans la condition GS, suivie de SS et de NT pour KG1. L'activation de LKB1 dans les cellules K562 est plus élevée dans la condition SS, suivi de GS et de NT (**Figure 27**).

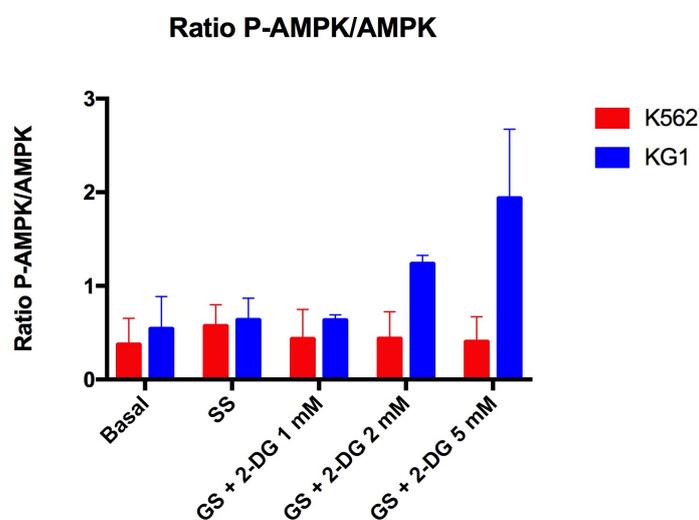


Figure 27. Représentation du ratio P-AMPK/AMPK total dans les lignées K562 et KG1 dans les conditions basales, de privation en sérum (SS) et de privation en glucose avec ajout de 2-déoxyglucose (GS + 2-DG).

L'activation de mTOR a été observée par les bandes de P-S6RP (S6RP phosphorylé) dans les conditions basales (NT) et de privation en sérum (SS) dans les deux lignées. En revanche, P-S6RP est très peu présente voir absente dans les trois conditions de privation en glucose testées (GS + 2-DG 1, 2 ou 5 mM) (**Figure 28**). Ceci est cohérent avec le fait que le 2-DG est décrit comme un composé réprimant l'activité de mTOR, tout en activant la voie LKB1/AMPK.

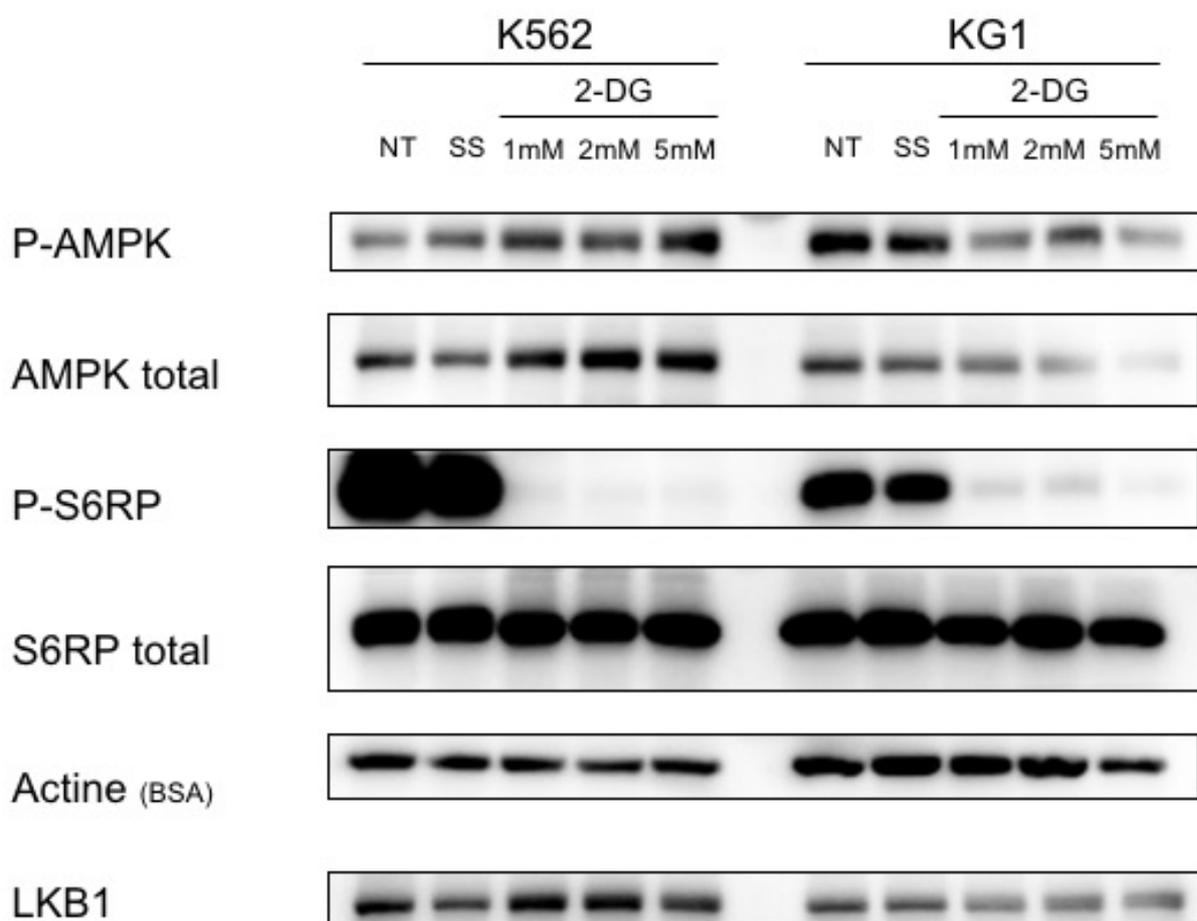


Figure 28. Western blot représentant l'étude de P-AMPK, AMPK total, P-S6RP, S6RP total et LKB1 dans les lignées K562 et KG1 dans les conditions basales (NT), de privation en sérum (SS) et de privation en glucose avec ajout de 2-déoxyglucose (GS + 2-DG).

4. Discussion

4.1. Les modifications du métabolisme lipidique et phospholipidique en lien avec la prolifération cellulaire et le pronostic

Dans une première partie, nos travaux ont porté sur la caractérisation des profils lipidiques des lignées cellulaires, en conditions de culture basale et en conditions de privation en sérum. Nous avons tout d'abord montré qu'à l'état de base, les quantités totales de lipides variaient entre les différentes lignées, ce qui nous a permis de choisir deux lignées sur lesquelles focaliser nos analyses pour la suite des expérimentations : KG1 et K562. En effet, KG1 une des lignées qui a le moins de lipides, et K562 est celle qui en a le plus. De plus, la composition en AG de KG1 est significativement différente de celle de K562, de même que l'abondance des différentes espèces lipidiques analysées par TLC. Ceci confirme et précise au niveau lipidique ce que nous avons montré dans une précédente étude¹⁴⁴, sur le fait que les lignées cellulaires de LAM présentent toutes des profils métaboliques différents dans leur état de base, en lien avec leur différence cytologique et génétique.

En conditions de starvation, de façon similaire à ce que nous avons observé sur les profils HRMAS, KG1 et K562 développent les mêmes mécanismes d'adaptation à la starvation et présentent exactement le même profil lipidique après 24h de culture dans le milieu sans sérum. Les profils révèlent une augmentation significative d'acide palmitoléique (C16:1), combinée à une diminution significative d'acide stéarique (C18:0) et des PUFA (C20:3, C20:4, C20:5 et C22:6). La génération d'acide palmitique (C16:0) et/ou d'acide palmitoléique induite par une kinase – la diacylglycérol kinase α (DGK α) – a été montrée dans une lignée cellulaire modèle de

LAL (Jurkat), en conditions de starvation en sérum¹⁴⁵. Il se trouve que cette kinase est décrite comme étant abondamment exprimée dans les cellules tumorales de plusieurs cancers, et notamment dans les mélanomes¹⁴⁶⁻¹⁴⁸, les hépatocarcinomes¹⁴⁹ et les lymphomes¹⁵⁰. L'acide stéarique est décrit dans la littérature comme ayant un rôle dans l'induction de l'apoptose des cellules cancéreuses¹⁵¹. Ceci est cohérent avec nos résultats car nos lignées dont le niveau d'acide stéarique diminue significativement, continuent de proliférer abondamment et de survivre dans ce milieu restrictif, assimilé à un stress métabolique. Nous pouvons en dire de même concernant la diminution des PUFA lorsque nos cellules prolifèrent. En effet, plusieurs équipes ont mis en évidence le fait que certains PUFA, dont l'EPA (C20:5) et le DHA (C22:6) ont un effet délétère sur le métabolisme des cellules cancéreuses et qui par conséquent entraîne leur apoptose^{107,112,152,153}. Ce résultat suggère que la régulation de certaines espèces lipidiques est un mécanisme d'adaptation des cellules tumorales pour continuer à proliférer même en condition de stress métabolique.

En analysant les différents spots lipidiques révélés par la TLC sur les deux lignées, il se trouve que les mêmes espèces sont significativement diminuées en starvation par rapport à l'état basal. Ceci concerne notamment la quantité de phosphatidyl-choline ((P)C), sphingomyéline (SM) et cardiolipine (CL). La (P)C et la SM ont des structures très proches : la SM est composée d'un céramide et d'une phosphocholine, et la (P)C est composée d'un glycérol et d'une phosphocholine. La phosphocholine (PC) peut donc provenir de l'un, de l'autre ou des deux composés. Dans nos analyses par RMN-HRMAS, on a observé une surexpression de PC dans les lignées à 24h de starvation. Dans l'analyse lipidomique, on observe une diminution de (P)C et de SM

dans les mêmes conditions. Ceci peut s'expliquer par le fait que ces deux composés sont consommés pour augmenter *in fine* la synthèse de PC par les cellules.

En ce qui concerne l'analyse des plasmas de patients, au premier abord on ne distingue pas de différence significative dans la teneur en AG des patients de pronostic favorable versus défavorable. Cependant, en analysant plus en détail la composition de chaque spot lipidique retrouvé par TLC, on observe que les PL suivants : SM, PI et PE sont augmentés significativement chez les patients de pronostic défavorable : de même que les LN suivants : DAG-Cho et FFA.

Si l'on va plus loin dans l'analyse détaillée des spots correspondant aux PL (SM, PI, PE et PC), on retrouve une augmentation significative de C18:1 et C20:1 dans les plasmas de patients de pronostic défavorable. Il est intéressant de noter que ces deux AG participent (avec également C18:0, C20:0, C22:0 et C24:0) à l'assemblage des PL dans le réticulum endoplasmique, et par extension à la biosynthèse des lipides dans les tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*¹⁵⁴. Si l'on fait le parallèle avec les cellules leucémiques de patients, c'est un résultat très intéressant puisqu'il est cohérent avec ceux que l'on a observé par RMN-HRMAS dans les cellules leucémiques des patients de mauvais pronostic, à savoir une surexpression des phospholipides PC et PE.

Par ailleurs, la quantité de LN est également augmentée chez les patients de pronostic défavorable. Les LN sont des lipides de stockage, gardés dans des gouttelettes lipidiques. La dégradation de ces lipides de stockage survient lorsque les demandes en énergie augmentent, en réponse à un stress métabolique. De récentes études ont montré que l'abondance de ces gouttelettes était liée à une

augmentation de l'agressivité des cancers ainsi qu'à une chimiorésistance ; favorisant ainsi la prolifération cellulaire cancéreuse^{70,155}. Notre étude confirme donc le lien entre l'augmentation de ces LN et le pronostic défavorable des patients.

4.2. Les dérégulations du métabolisme de l'alanine en lien avec la voie LKB1/AMPK/mTOR

Notre hypothèse était basée sur le fait que les dérégulations de la production d'alanine en lien avec des dérégulations de LKB1 constituent un mécanisme de reprogrammation métabolique jouant un rôle clé dans la progression tumorale et la résistance à la chimiothérapie des cellules leucémiques.

Dans l'étude des lignées cellulaires, il a été confirmé que les profils d'alanine varient à l'état de base, avec KG1 et K562 ayant les niveaux d'alanine les plus bas et les plus élevés, respectivement. Ces deux lignées ont ensuite été soumises à une privation de sérum et de glucose, et nos résultats montrent que dans ces conditions de faible teneur en nutriments, les niveaux d'alanine diminuent par rapport aux conditions basales. Ceci est intéressant, car l'axe LKB1/AMPK est également activé lors de conditions de faible teneur en nutriments dans les cellules de LAM¹⁵⁶. Nous avons prouvé cela sur ces mêmes lignées en effectuant un western blot pour étudier les médiateurs de la voie LKB1/AMPK, comprenant : l'AMPK totale, l'AMPK phosphorylée (P-AMPK), Par conséquent, la diminution des niveaux d'alanine dans les lignées cellulaires observée dans cette étude pourrait être due à l'activation de LKB1/AMPK qui limite potentiellement l'activité de l'ALAT (Alanine Amino Transférase).

L'ALAT est une enzyme responsable du métabolisme de l'alanine par conversion réversible du pyruvate en alanine dans les cellules¹⁵⁷. Récemment, un lien entre la voie LKB1 et l'activité de l'ALAT a été découvert dans une population particulière de cellules souches embryonnaires – les cellules de crête neurale – dans lesquelles la voie LKB1/AMPK était capable d'entraver l'activité de l'ALAT¹⁴³. En gardant cela à l'esprit, nous avons émis l'hypothèse qu'un mécanisme similaire pourrait éventuellement être actif dans les cellules leucémiques, et pourrait aider à comprendre notre observation précédente d'un profil d'alanine élevé dans les cellules de patients chimiorésistants. Si la voie LKB1 limite effectivement l'activité de l'ALAT ou favorise le cycle alanine-pyruvate et réduit ainsi les niveaux d'alanine, la suppression de l'axe LKB1/AMPK permettrait à l'ALAT de fonctionner et fournirait une explication des niveaux élevés d'alanine chez les patients chimiorésistants.

De plus nous avons montré que la protéine ribosomale S6 phosphorylée (P-S6RP) (témoin de l'activation de mTOR) était fortement surexprimé en condition de privation en sérum (SS) mais pas en condition de privation en glucose (GS). La voie mTOR est donc activée en conditions de starvation en sérum, et cette activation est effective au moyen d'un autre processus que la voie LKB1/AMPK, par exemple la voie PI3K/AKT.

Le rapport P-AMPK/AMPK total montre ainsi une activation de LKB1 plus élevée dans la condition GS, suivie de SS et de NT pour KG1. L'activation de LKB1 dans les cellules K562 est plus élevée dans la condition SS, suivi de GS et de NT. La déprivation en glucose active donc plus spécifiquement la voie LKB1/AMPK que la déprivation en sérum, comme décrit dans la littérature, créant ainsi une condition de stress plus spécifique de l'activation de la voie LKB1/AMPK.

Nous montrons donc que l'axe LKB1/AMPK est fonctionnel dans nos modèles cellulaires de leucémie, ce qui est cohérent avec les travaux précédemment décrits dans la littérature¹²⁴. Ce qui est intéressant, c'est que cet axe, caractérisé récemment comme étant suppresseur de tumeur, peut être activé par des molécules pharmacologiques telles que la metformine ou l'AICAR (Aminolimidazole CARboxamide Ribonucleotide) dans les cellules cancéreuses. La plupart des preuves expérimentales de l'activité antitumorale de ces agonistes de l'AMPK proviennent de l'étude de tumeurs solides telles que les cancers du sein ou de la prostate, et seules quelques données sont disponibles sur les hémopathies malignes, mais des résultats intéressants ont été publiés dans les LAM. L'équipe de Green *et al.* a notamment montré que la metformine réduisait le recrutement des molécules d'ARNm codant pour des protéines oncogènes, entraînant une forte activité anti leucémique contre les cellules de LAM tout en épargnant l'hématopoïèse normale *ex vivo* et en réduisant significativement la croissance des cellules LAM chez les souris¹⁵⁸. Il serait fortement intéressant d'explorer le potentiel de cette voie pour traiter les patients atteints de LAM. Par ailleurs, l'activation de mTOR induit une augmentation de la production de DAG, favorisant la synthèse de PC et PE⁷⁴. Cela nous conforte donc dans le fait qu'il est crucial de trouver des molécules pharmacologiques capables d'inhiber mTOR dans les LAM.

Discussion générale

1. Les voies métaboliques activées dans les lignées cellulaires de LAM dépendent de leur génotype et des conditions micro-environnementales

La caractérisation métabolique de différents modèles cellulaires de leucémie aigüe myéloïde par une approche métabolomique non ciblée, grâce à la méthode de RMN-HRMAS, a été étudiée dans la première partie de ce travail de thèse. Nous avons ainsi montré que cinq lignées leucémiques, caractérisées par des différences génétiques et cytologiques, présentaient des modifications significatives dans leur profil métabolique lorsqu'elles étaient mises en culture dans un milieu basal.

Chaque lignée est caractérisée par la surexpression d'un métabolite spécifique, qui est le principal représentant d'une voie métabolique spécifique. La lignée HL60 a une signature métabolique liée au métabolisme du glutamate/de la glutamine, tandis que la voie métabolique prédominante chez HEL est le métabolisme des inositols. Concernant KG1, le métabolisme des phospholipides est mis en avant dans cette lignée, et la lignée K562 est caractérisée par une signature métabolique mettant en jeu des acides aminés tels que l'alanine. Enfin, la lignée OCI-AML3 semble être représentée par une forte surexpression du métabolisme de l'aspartate/asparagine et taurine. En 2009, une équipe avait mis en lumière des différences entre des lignées leucémiques de LAM dans leur état basal, Nous avons trouvé des points communs avec ces résultats présentés par l'équipe de Tiziani *et al*, notamment concernant les variations de quelques métabolites (myo-inositol, phosphocréatine/créatine et phosphocholine) dans les lignées HL60 et K562. Cependant, concernant la lignée KG1, on note une divergence au niveau du métabolisme basal de l'alanine, que l'on trouve très faiblement exprimée dans notre étude, Tiziani *et al* retrouvant une forte

expression de l'alanine dans leur lignées KG1a¹⁵⁹. Cette opposition est très probablement due au fait que les deux lignées étudiées ne sont pas les mêmes au niveau basal. En effet, KG1a est un sous-clone de la lignée mère KG1, décrite comme un variant non différencié. Ces données montrent que les caractéristiques métaboliques des LAM dépendent de leurs statuts génétiques, et donc qu'il existe une diversité des profils métaboliques reflétant la diversité des profils moléculaires des LAM. Ainsi, le développement de thérapies ciblant le métabolisme pour traiter les LAM nécessite de mieux caractériser ces différents mécanismes d'adaptation métabolique afin de proposer des solutions thérapeutiques adaptées à la diversité des progéniteurs leucémiques.

Dans un deuxième temps, ces mêmes lignées leucémiques ont été soumises à un stress métabolique, induit par la carence en sérum. La conséquence de ce changement micro-environnemental a été l'adaptation métabolique rapide de toutes les lignées à ce milieu de culture sans sérum. En effet, elles ont toutes continué à proliférer et survivre malgré le manque de nutriments, en mettant en place des mécanismes de compensation, tels que l'augmentation de PC et de GSH à 24h de culture dans ce milieu carencé. Ces résultats modèrent la notion de dépendance ou d'addiction aux nutriments, décrite dans la littérature¹⁶⁰, puisque nous montrons que les lignées sont capables de modifier leur profil métabolique pour compenser la carence et maintenir leur prolifération. Ce qui est intéressant, c'est que cette adaptation métabolique dans des conditions de stress surpasse les différences significatives au niveau métabolique démontrées dans ces lignées à l'état basal. Des aberrations du métabolisme de la choline ont été décrites dans de nombreux cancers⁷³. Il s'agit d'une caractéristique métabolique relativement nouvelle qui reflète les interactions complexes entre la signalisation oncogénique et le métabolisme

cellulaire. Cette aberration provoque une augmentation de la PC dans les cellules malignes. Dans nos lignées cellulaires de leucémie, cela pourrait être un marqueur potentiel de résistance aux conditions de stress et donc un facteur d'agressivité. De façon similaire et moins surprenante, le métabolisme du glutathion est altéré dans les cellules leucémiques. En effet, des modifications de l'équilibre redox ont été retrouvées dans de nombreux cancers, y compris dans les LAM^{87,161}.

Enfin, des études antérieures ont montré que les cellules leucémiques sont capables de modifier et d'adapter leur métabolisme lorsque leurs conditions environnementales changent, notamment lors de l'ajout de drogues dans le milieu de culture^{162,163}, ou de la privation de composés essentiels à leur croissance¹⁶⁴.

De façon globale, cela suggère que le remodelage de certaines voies métaboliques est un mécanisme majeur et partagé d'adaptation au stress dans les cellules cancéreuses. Le ciblage thérapeutique de ces mécanismes pourrait donc se concevoir comme un traitement complémentaire augmentant l'efficacité thérapeutique de traitement de chimiothérapie.

2. La reprogrammation métabolique des cellules leucémiques dépend du phénotype et du génotype des patients et joue un rôle pronostique significatif

Dans la seconde partie de ce travail de thèse, la même méthode d'analyse par RMN-HRMAS a été utilisée sur des prélèvements de moelle osseuse de patients atteints de LAM *de novo* au diagnostic. Cette méthode nous a permis d'affiner nos connaissances sur les caractéristiques métaboliques des cellules leucémiques, afin

d'élucider les mécanismes développés par ces cellules pour favoriser leur prolifération, et l'impact de ces dérégulations sur le pronostic des patients.

2.1. Les blastes de patients présentent des différences significatives de leur métabolisme selon leur niveau de différenciation

L'analyse globale des métabolites exprimés par les cellules leucémiques montrent que le spectre d'expression varie de façon assez importante entre les patients. Une première analyse selon le sous-type FAB (marqueur de la différenciation cellulaire) permet d'identifier des différences nettes entre ces sous-types. Ceci est cohérent avec le fait que chaque sous-type de la classification FAB correspond à un ou plusieurs types de progéniteurs leucémiques, chacun défini par son stade de différenciation et de maturation, ainsi que par différents marqueurs enzymatiques. De façon intéressante, les différences entre les sous-types de LAM sont nettement plus significatives lorsque l'analyse exclut le 2-HG. Son impact sur le modèle statistique semble logique, car l'oncométabolite produit en présence de la mutation IDH est retrouvé dans tous les sous-types FAB de LAM confondus et en grande quantité, ce qui masque les différences moins importantes dans les profils métaboliques des patients lorsqu'on les analyse tous ensemble. Pour approfondir l'étude du lien différenciation/métabolisme, nous avons en outre tenté de corréler les caractéristiques métaboliques des patients avec le phénotype de différenciation des cellules leucémiques. Nous avons constaté que le 2-HG était surexprimé chez les patients de phénotype CD34⁻/MPO⁺, parmi les sous-types M0, M1 et M2. Le 2-HG était le métabolite le plus représentatif des stades avancés de différenciation dans ces sous-types, avec 11 patients sur 13 mutés pour le gène IDH (85%) qui ont été

classés comme sous-types M1 ou M2 au moment du diagnostic. Ceci a déjà été décrit dans la LAM de l'enfant¹⁶⁵ ainsi que chez les patients adultes¹⁶⁶. Chez les patients M4 et M5, la glutamine a été retrouvée surexprimée chez les patients arborant le phénotype CD14⁺/CD300e⁺, correspondant aux cellules monocytaires. Zellner et al. ont mis en évidence le fait que les monocytes sont les cellules principales qui utilisent la glutamine comme un substrat énergétique important¹⁶⁷. De plus, il a été décrit dans les cellules d'hépatocarcinome que la glutamine était principalement augmentée à des stades matures du cancer¹⁶⁸.

2.2. Il existe un lien entre le métabolisme et le statut moléculaire des cellules leucémiques

Nous avons pu analyser les différences métaboliques selon le statut de trois gènes : IDH, NPM1 et FLT3. De façon intéressante, nous retrouvons des altérations métaboliques qui semblent corrélées au génotype des patients. Concernant la mutation IDH, le lien entre le statut moléculaire et le métabolisme est décrit depuis plusieurs années. Dans la littérature, plusieurs équipes ont mesuré cette quantité de 2-HG par chromatographie liquide ou gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, dans des sérums provenant du sang périphérique chez des patients non mutés vs mutés. Elle peut alors varier d'un facteur 20 à 50 entre ces deux groupes de patients (61 ng/mL vs 3004 ng/mL en moyenne pour l'équipe de Dinardo¹⁶⁹ et 1,2 µmol/L vs 21,2 µmol/L pour l'équipe de Janin¹⁷⁰). Notre étude retrouve ce lien mais surtout montre, pour la première fois à notre connaissance, l'impact de la mutation sur la sécrétion intracellulaire de 2-HG. Ce lien est très significatif puisque nous avons pu déterminer à l'aide d'une courbe ROC un seuil permettant de discriminer avec

presque 100% de spécificité les patients mutés des patients non mutés. Dans notre étude, il n'a pas été observé de différence au niveau des quantités de 2-HG mesurées entre les mutations IDH1 et IDH2. La quantité mesurée de 2-HG est cependant relative, car elle correspond à l'amplitude d'un des pics de ce métabolite identifié en RMN. Cela nous a tout de même permis de déterminer un seuil à 1160 u.a. indiquant que les patients ayant une quantité de 2-HG supérieure à ce seuil sont porteurs de la mutation IDH. Ainsi, la mesure intracellulaire de ce métabolite pourrait être un biomarqueur très significatif des modifications métaboliques induites par la mutation.

Concernant les mutations NPM1 et FLT3, il existe des différences métaboliques mais moins significatives. En effet, les altérations métaboliques sont plus générales car elles ne touchent pas une enzyme clé du métabolisme comme dans le cas d'IDH. On observe plusieurs métabolites qui sont considérés comme discriminants entre les patients mutés et non mutés pour ces deux gènes. Ceci pourrait être le reflet de l'activation générale de la cellule leucémique au niveau métabolique pour permettre les besoins associés à l'activation de la prolifération, comme par exemple, l'accélération de la production de phospholipides membranaires chez les patients mutés FLT3-ITD. En effet, lorsque le gène FLT3 est muté dans les LAM, cela entraîne une prolifération plus importante des cellules cancéreuses parallèle à une activation de plusieurs voies de signalisation, telles que PI3K/AKT et la voie des MAPK¹⁷¹, augmentant de fait leur survie et diminuant l'apoptose. D'autre part, la mutation du gène NPM1 induit l'assemblage d'un grand nombre de protéines requises pour la biogenèse des ribosomes, et de ce fait contribue à la croissance et à la prolifération cellulaire¹⁷².

2.3. Les différences de profils métaboliques des blastes ont un impact sur le pronostic des patients

L'activation et la dérégulation de certaines voies métaboliques étant des processus développés par les cellules cancéreuses pour favoriser leur survie – et donc favoriser la progression de la maladie –, il est très probable que la surexpression de certains métabolites et/ou de certaines voies métaboliques puissent avoir un impact sur le pronostic des patients. Notre étude a retrouvé plusieurs résultats en ce sens. Concernant l'analyse pronostique, nous avons comparé les profils métaboliques des patients classés dans les groupes favorable et défavorable selon les recommandations de l'ELN de 2017, ainsi que ceux des patients chimiosensibles et chimiorésistants. Fait intéressant, les mêmes métabolites sont surexprimés dans le sous-groupe pronostique défavorable et chez les patients chimiorésistants, en particulier le niveau de GSH. Ce métabolite est apparu comme un mauvais marqueur pronostique, suggérant que les cellules leucémiques ont un métabolisme aberrant du glutathion. Dans la littérature, l'augmentation de ce métabolite est associée à une réponse fortement proliférative, indispensable à la progression du cycle cellulaire⁶⁴. Cette augmentation du GSH peut être corrélée avec le nombre de patients en rechute, et les patients du groupe pronostique défavorable sont plus à risque de rechute que les autres en raison de leur caryotype complexe et des mutations associées¹⁷³. De plus, l'augmentation du GSH est un facteur majeur contribuant à la résistance aux médicaments, à travers différents mécanismes. Ce métabolite peut être lié ou réagir avec des substances médicamenteuses, interagir avec les ROS et également aider à éviter des dommages à l'ADN⁶⁴. Une expression élevée de glutathion-S-transférase combinée à des niveaux élevés de GSH peut augmenter le

taux de conjugaison et de détoxification des agents de chimiothérapie, diminuant considérablement leur efficacité¹⁷⁴. De plus, des niveaux de glutathion oxydé au diagnostic plus faibles chez les patients LAM survivants que chez les patients non survivants ont été rapportés⁸⁷.

2.4. Les dérégulations du métabolisme phospholipidique ont un rôle particulier sur le pronostic, la survie et la réponse au traitement

Nos différentes analyses des profils métaboliques révèlent une surexpression redondante de la PC associée à la PE dans plusieurs groupes de patients. En effet, on retrouve l'augmentation de ces deux métabolites dans le groupe de pronostic défavorable, ainsi que chez les patients non porteurs de la mutation IDH. Des niveaux élevés de PE indiquent une prolifération cellulaire intense, fréquemment observée dans les cancers, associée à une augmentation de la PC⁷⁵. Wang *et al.* ont observé que la PC était exprimée à un niveau plus élevé dans les sérums de patients à risque intermédiaire par rapport à un risque favorable¹¹⁴. Enfin, très récemment, l'équipe de Viswanath *et al.* a montré que la synthèse *de novo* de PC et PE, ainsi que l'activité enzymatique des choline kinases et éthanolamine kinases étaient considérablement diminuées chez les patients atteints de gliomes IDH mutés vs IDH wild-type. Ils ont notamment établi un lien entre cette régulation négative et le 2-HG, qui serait responsable de ces phénomènes *via* la stabilisation de HIF-1 α ¹⁷⁵. Nos résultats confirment ce lien particulier entre le 2-HG et le métabolisme des phospholipides dans les LAM *de novo*, et fournissent des résultats supplémentaires suggérant que la valeur pronostique de la mutation IDH pourrait être médiée par la régulation des phospholipides par le 2-HG.

D'autre part, la PC et la PE sont largement décrits comme étant des marqueurs d'agressivité et de progression tumorale dans les cancers. Toujours au niveau neurologique, deux études ont montré que des patients ayant un gliome de bas grade ayant progressé en gliome de haut grade présentaient des niveaux beaucoup plus élevés de ces deux métabolites^{176,177}. On sait également que la surexpression des choline kinases dans les cancers conduit à une élévation des niveaux de PC. Les cellules acquièrent un phénotype agressif, qui supporte le rôle des choline kinases dans le contrôle de l'invasion cellulaire et de la résistance aux thérapies. Ceci fait de la PC un biomarqueur de l'agressivité des cancers¹⁷⁸. De plus, dans notre étude, la PE est surexprimée chez les patients FLT3-ITD mutés ainsi que chez les patients chimiorésistants au traitement. Ceci est cohérent avec le fait que ce métabolite a un réel impact défavorable sur la survie globale. Enfin, une étude récente montre que l'enrichissement des voies métaboliques basé sur les métabolites altérés dans les LAM (analyse de sérum sanguins) est secondaire à une augmentation de PE, PC et PI chez les patients non répondeurs au traitement ayant une LAM très agressive, versus les patients non répondeurs ayant une LAM moins agressive¹⁰³. Ceci conforte encore le fait que les phospholipides sont bien des marqueurs d'agressivité dans les LAM comme dans d'autres tumeurs solides.

3. Les résultats des analyses complémentaires confirment nos hypothèses de départ

3.1. L'augmentation de la charge lipidique des cellules est corrélée à un pronostic défavorable dans les LAM

L'analyse du lipidome des lignées cellulaires leucémiques ainsi que des plasmas de patients avait pour objectif de nous aider à mieux comprendre les mécanismes développés par les cellules leucémiques, dont celui de la dérégulation du métabolisme lipidique identifié en HRMAS, pour survivre dans un environnement dans lequel plusieurs stress métaboliques sont induits. Nos résultats sur les lignées cellulaires KG1 et K562 nous ont permis de confirmer que l'augmentation de la phosphocholine était une caractéristique commune aux cellules cultivées dans un milieu privé de sérum. Ce métabolite est le signe d'une adaptation métabolique des cellules leucémiques, lorsque l'on modifie *in vitro* l'environnement physiologique des blastes de LAM.

En ce qui concerne l'analyse des plasmas de patients, l'augmentation de la quantité de phospholipides, et en particulier de PC et PE, chez les patients de pronostic défavorable, confirme que les PL sont des marqueurs d'agressivité et de progression tumorale associés à un pronostic sombre dans les LAM. Ces résultats sont concordants avec ceux décrits dans la littérature, dans les cancers de façon générale^{75,76}. D'autre part, nous avons retrouvé une augmentation de la quantité de lipides neutres, qui sont des lipides de stockages, chez les patients de pronostic défavorable. L'abondance de ces LN dans les gouttelettes lipidiques a été démontrée

comme étant un marqueur d'agressivité, ce qui nous conforte encore une fois sur le lien entre ces lipides et le mauvais pronostic des patients atteints de LAM⁷⁰.

3.2. La compréhension du métabolisme de l'alanine ouvre la voie à l'exploration du métabolisme d'autres acides aminés dans les LAM

La compréhension des dérégulations de l'alanine dans les cellules leucémiques nous a permis de confirmer que le lien entre le métabolisme de cet acide aminé et les dérégulations de la voie LKB1/AMPK existe dans les LAM, et peut potentiellement constituer un mécanisme de reprogrammation métabolique. Un autre exemple de perturbation du métabolisme de l'alanine a été décrit dans l'adénocarcinome canalaire pancréatique. Dans ce cancer, les cellules étoilées pancréatiques dans le stroma autour de la tumeur sécrètent de l'alanine (*via* un mécanisme autophagique induit par la tumeur), qui est ensuite absorbée par les cellules tumorales elles-mêmes pour alimenter le cycle de Krebs *via* des réactions anaplérotiques qui génèrent du pyruvate. Il est intéressant de noter que cette alanine sécrétée est la principale source de carbone pour le cycle de Krebs dans ces tumeurs, supplantant même le carbone dérivé de la glutamine et du glucose, qui sont les deux principaux fournisseurs de carbone favorisant le cancer et la survie cellulaire¹⁷⁹. Cela permet l'utilisation du glucose et de la glutamine pour d'autres réactions, en fonction de la demande du tissu cancéreux^{179,180}.

D'autre part, une analyse *in silico* complémentaire a été effectuée dans notre laboratoire et a permis d'explorer une dizaine de gènes supplémentaires à l'aide du portail GDC (<https://portal.gdc.cancer.gov>). Ces gènes sont : GPT1 (glutamate-

pyruvate transaminase 1; également appelée ALAT), GPT2, GLUL (glutamate-ammoniac ligase), GLS (glutaminase), GLS2, GLUD1 (glutamate déshydrogénase 1), GLUD2, ASNS (asparagine synthétase), GOT1 (glutamique-oxaloacétate transaminase 1; également appelée aspartate aminotransférase ou ASAT) et GOT2. Ces gènes ont été explorés car ils codent tous pour des enzymes métaboliques qui modifient la production d'acides aminés dont la biosynthèse est couplée à celle de l'alanine, et qui ont été précédemment trouvés modifiés chez des patients atteints de LAM dans notre laboratoire de recherche ou dans la littérature. Travailler sur des enzymes comme l'asparagine synthétase (ASNS) pourrait être une autre piste, car la littérature récente a montré que l'équilibre aspartate-asparagine régi par l'ASNS affecte la voie LKB1 et conduit à l'activation dépendante de p53 de l'AMPK¹²⁶. Il s'agit du premier cas où un lien direct entre ASNS et LKB1 a été décrit. La GLS est un autre exemple d'enzyme qui a été profondément explorée dans la LAM¹⁰¹. Elle régule l'homéostasie glutamine-glutamate. Ceci est important car le GSH est dérivé du glutamate et joue un rôle crucial dans la prévention des dommages redox aux cellules, notamment dans les LAM comme nous l'avons constaté précédemment. Cette étude *in silico* fournit donc des informations préliminaires sur le rôle et les interconnexions entre le métabolisme des acides aminés (y compris les enzymes régulant leur synthèse) et la signalisation LKB1. Des études supplémentaires sont cruciales dans ce domaine afin d'acquérir une meilleure compréhension des altérations métaboliques dans les LAM, provoquées par ces enzymes métaboliques, pour identifier des cibles thérapeutiques pouvant faciliter des thérapies personnalisées et améliorer le pronostic.

Conclusion générale

En conclusion, nos travaux nous ont permis d'approfondir les connaissances sur la reprogrammation métabolique dans les LAM et son rôle clef pour le pronostic des patients. En particulier nous avons pu mettre en évidence plusieurs points caractéristiques des cellules leucémiques de LAM :

- Les cellules leucémiques activent des voies métaboliques particulières et différentes selon leur statut génétique et phénotypique : la caractérisation des profils métaboliques *in vitro* et *in vivo* nous a permis d'identifier un métabolisme particulier pour chaque génotype/phénotype de leucémie. Cependant, face à une situation de stress métabolique, les cellules leucémiques de différents modèles cellulaires de LAM développent un mécanisme commun d'adaptation métabolique.
- Le cas particulier de l'IDH et de la synthèse de 2-HG : nous avons pu mettre en évidence et confirmer le lien déjà connu entre le statut moléculaire et la synthèse de 2-HG, et pour la première fois à notre connaissance l'impact de la production intracellulaire de cet oncométabolite dans la reprogrammation métabolique des LAM, et son rôle majeur en tant que biomarqueur pronostic favorable dans notre cohorte de patients.
- Le rôle particulier du métabolisme lipidique dans la survie des cellules leucémiques en situation de stress : la caractérisation des profils métaboliques et lipidiques des lignées et des patients nous a permis de mettre en lumière le rôle particulier des phospholipides qui donne un avantage prolifératif aux

blastés sur les cellules normales, et qui ont un impact très défavorable chez les patients LAM.

- Les mécanismes d'adaptation métabolique mettent en jeu la voie LKB1/AMPK/mTOR et soulignent le rôle particulier de la synthèse de certains acides aminés : il existe un lien entre le métabolisme de l'alanine et les dérégulations de la voie LKB1/AMPK/mTOR dans les LAM, qui suggère que des perturbations d'autres acides aminés (glutamine/glutamate, asparagine/aspartate) puissent constituer un mécanisme de reprogrammation métabolique jouant un rôle dans la réponse à la chimiothérapie dans les LAM, et donc dans le pronostic des patients.
- Le pronostic des patients est significativement associé à la synthèse lipidique et à l'équilibre redox : les analyses métabolomiques et lipidomiques ont confirmé l'impact négatif de la synthèse des phospholipides *in vitro* et *in vivo* dans les LAM, traduit par leur abondance significativement plus élevée chez les patients de pronostic défavorable. Il en est de même pour la synthèse du glutathion réduit (GSH), qui se révèle être un marqueur lié à la chimiorésistance chez les patients.

Ces résultats nous ont ainsi permis de réaliser une cartographie des dérégulations métaboliques observées dans les cellules leucémiques (**Figure 29**) qui identifie plusieurs « nœuds » particuliers dont le ciblage thérapeutique serait susceptible, en addition aux traitements conventionnels, de modifier significativement la survie des patients.

- La régulation des niveaux de synthèse des acides aminés peut être ciblée à l'aide d'inhibiteurs d'enzymes responsables de leur biosynthèse. Par exemple, la chloro-alanine, qui est un inhibiteur de l'ALAT, pourrait être un bon candidat, de même que les inhibiteurs de la glutamine synthétase, de la glutamate déshydrogénase et de l'asparagine synthétase (ASNS). De plus, la L-asparaginase est un traitement qui fait actuellement partie intégrante des schémas de chimiothérapie utilisés dans la LAL. En effet, une déplétion adéquate des niveaux d'asparagine est considérée comme un facteur important dans l'obtention de résultats thérapeutiques optimaux chez ces patients¹⁸¹. Il serait intéressant de pouvoir approfondir cette piste dans les LAM également.
- L'exploration du potentiel de l'axe LKB1/AMPK grâce à des agonistes d'AMPK pourrait nous aider à inhiber mTOR et servir ainsi de thérapeutique anti-cancéreuse dans les LAM. Parmi ces molécules, on retrouve notamment la metformine, qui va inhiber la chaîne respiratoire mitochondriale, augmentant ainsi le pool intracellulaire d'AMP qui va permettre d'activer AMPK ; et l'AICAR, qui va agir en compétition avec l'AMP pour se lier sur le site d'AMPK afin de l'activer.
- Enfin, le métabolisme aberrant des phospholipides de la choline et de l'éthanolamine dans le cancer a été récemment établi comme une caractéristique métabolique universelle du cancer. Le ciblage de ces dérégulations semble une piste prometteuse, mais les connaissances actuelles sur les cibles médicamenteuses dans le métabolisme de la choline sont encore préliminaires. Cependant, une image assez complète de leur régulation, des rôles oncogéniques et des réseaux d'interaction dans le cancer

devient disponible pour quelques enzymes telles que la choline kinase α et la phospholipase D1.

Au total, nos résultats sont prometteurs quant au ciblage thérapeutique des dérégulations du métabolisme mises en évidence dans ce travail pour pouvoir améliorer de façon significative la prise en charge thérapeutique des patients atteints de LAM.

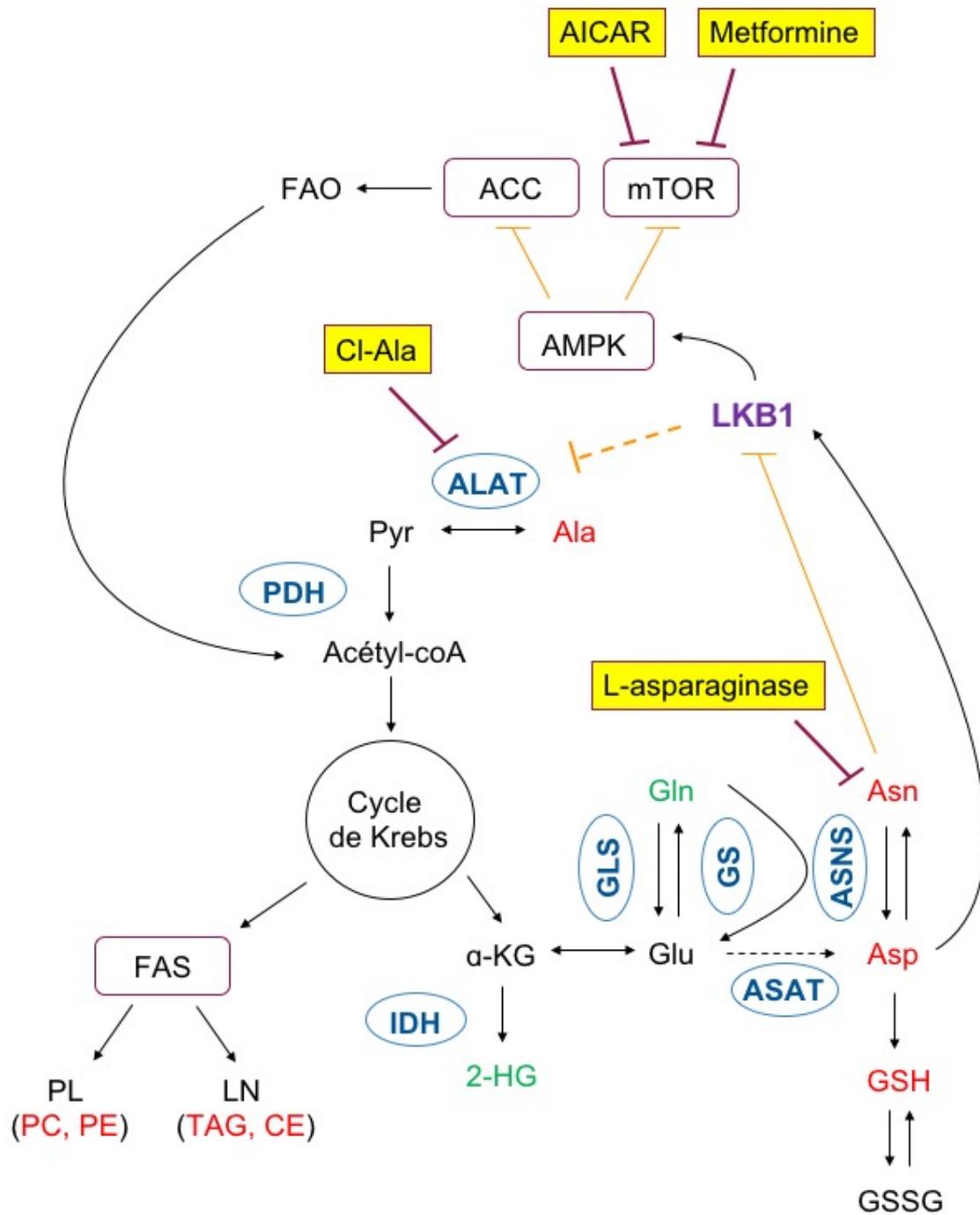


Figure 29. Aperçu global du réseau métabolique dans les LAM. La figure est une représentation schématique issue de la littérature et de nos recherches, basée sur les enzymes métaboliques et les principales voies impliquées dans la progression des LAM.

Les métabolites en vert représentent ceux ayant un impact favorable sur le pronostic, ceux en rouge représentent ceux ayant un impact défavorable. LKB1 est un senseur d'AMP/ATP. Pour refournir les niveaux d'énergie de la cellule en condition de stress métabolique, LKB1 phosphoryle AMPK qui va alors activer des réactions cataboliques générant de l'ATP et inhiber des réactions anaboliques consommant de l'ATP. Une des voies consommatrices d'énergie inhibée par AMPK est la voie de synthèse protéique mTOR. De plus, AMPK inhibe l'ACC, engendrant le phénomène de FAO, qui entraîne la production d'acétyl-coA qui va à nouveau entrer dans le cycle de Krebs et relancer un cycle de production de nouveaux lipides (FAS) et entraîner par conséquent la production de lipides membranaires, pouvant se diviser (PL) ou se stocker (LN). La littérature récente a montré que l'équilibre aspartate-asparagine régi par l'ASNS affecte la voie LKB1. Enfin, en jaune sont mises en évidence les molécules pharmacologiques à l'étude permettant d'inhiber les métabolites, enzymes ou voies de signalisation ayant un impact défavorable dans les LAM.

ACC : Acétyl-coA Carboxylase, AICAR : Aminolmidazole CARboxamide Ribonucleotide, Ala : alanine, Asn : asparagine, Asp : aspartate, Cl-Ala : Chloro-alanine, FAO : Fatty Acid Oxidation, FAS : Fatty Acid Synthesis, Gln : glutamine, GLS : glutaminase, Glu : glutamate, GS : Glutamine Synthétase, GSSG : forme oxydée du glutathion, PDH : Pyruvate Déshydrogénase, Pyr : pyruvate.

Bibliographie

1. Kayser S, Levis MJ. Advances in targeted therapy for acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2018;180(4):484-500. doi:10.1111/bjh.15032
2. Defossez G, Le Guyader-Peyrou S, Uhry Z, et al. Synthèse - Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 - Ref: SYNINCENAT19. <https://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Synthese-Estimations-nationales-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-France-metropolitaine-entre-1990-et-2018>. Accessed August 17, 2019.
3. Schiffer CA, Stone RM. Morphologic Classification and Clinical and Laboratory Correlates. *Holland-Frei Cancer Medicine 6th edition*. 2003. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13452/>. Accessed August 16, 2019.
4. Paessler ME, Helfrich M, Wertheim GBW. Cytochemical Staining. In: Fortina P, Londin E, Park JY, Kricka LJ, eds. *Acute Myeloid Leukemia*. Vol 1633. New York, NY: Springer New York; 2017:19-32. doi:10.1007/978-1-4939-7142-8_2
5. Cruise MW. Immunohistochemistry in Acute Myeloid Leukemia. In: Fortina P, Londin E, Park JY, Kricka LJ, eds. *Acute Myeloid Leukemia*. Vol 1633. New York, NY: Springer New York; 2017:33-49. doi:10.1007/978-1-4939-7142-8_3
6. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-2405. doi:10.1182/blood-2016-03-643544
7. Prada-Arismendy J, Arroyave JC, Röthlisberger S. Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. *Blood Reviews*. 2017;31(1):63-76. doi:10.1016/j.blre.2016.08.005
8. Kwaan HC, Wang J, Boggio LN. Abnormalities in hemostasis in acute promyelocytic leukemia. *Hematological Oncology*. 2002;20(1):33-41. doi:10.1002/hon.687
9. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive

review and 2016 update.' *Blood Cancer Journal*. 2016;6(7):e441-e441. doi:10.1038/bcj.2016.50

10. The Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2013;368(22):2059-2074. doi:10.1056/NEJMoa1301689

11. Kishtagari A, Levine RL, Viny AD. Driver mutations in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol*. 2020;27(2):49-57. doi:10.1097/MOH.0000000000000567

12. Castelli G, Pelosi E, Testa U. Emerging Therapies for Acute Myelogenous Leukemia Patients Targeting Apoptosis and Mitochondrial Metabolism. *Cancers*. 2019;11(2):260. doi:10.3390/cancers11020260

13. Dohner H, Estey EH, Amadori S, 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):453-474. doi:10.1182/blood-2009-07-235358

14. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJP. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood*. 2016;127(1):29-41. doi:10.1182/blood-2015-07-604496

15. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. Longo DL, ed. *New England Journal of Medicine*. 2015;373(12):1136-1152. doi:10.1056/NEJMra1406184

16. Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424-447. doi:10.1182/blood-2016-08-733196

17. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, et al. Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2012;366(12):1079-1089. doi:10.1056/NEJMoa1112304

18. Dohner K. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*. 2005;106(12):3740-3746. doi:10.1182/blood-2005-05-2164

19. Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2014 Update on risk-stratification and management: AML: 2014 Update on Risk-Stratification and Management. *American Journal of Hematology*. 2014;89(11):1063-1081. doi:10.1002/ajh.23834
20. Gratwohl A, Pasquini MC, Aljurf M, et al. One million haemopoietic stem-cell transplants: a retrospective observational study. *The Lancet Haematology*. 2015;2(3):e91-e100. doi:10.1016/S2352-3026(15)00028-9
21. Kassim AA, Savani BN. Hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: A review. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*. 2017;10(4):245-251. doi:10.1016/j.hemonc.2017.05.021
22. Stock W. Current treatment options for adult patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*. 2010;51(2):188-198. doi:10.3109/10428190903452834
23. de Thé H, Le Bras M, Lallemand-Breitenbach V. Acute promyelocytic leukemia, arsenic, and PML bodies. *The Journal of Cell Biology*. 2012;198(1):11-21. doi:10.1083/jcb.201112044
24. Sanz MA, Lo-Coco F. Modern Approaches to Treating Acute Promyelocytic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(5):495-503. doi:10.1200/JCO.2010.32.1067
25. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a *FLT3* Mutation. *New England Journal of Medicine*. 2017;377(5):454-464. doi:10.1056/NEJMoa1614359
26. Sami SA, Darwish NHE, Barile ANM, Mousa SA. Current and Future Molecular Targets for Acute Myeloid Leukemia Therapy. *Curr Treat Options Oncol*. 2020;21(1):3. doi:10.1007/s11864-019-0694-6
27. Wang ES, Tallman MS, Stone RM, et al. Low Relapse Rate in Younger Patients \leq 60 Years Old with Newly Diagnosed *FLT3*-Mutated Acute Myeloid Leukemia (AML) Treated with Crenolanib and Cytarabine/Anthracycline Chemotherapy. *Blood*. 2017;130(Suppl 1):566-566.
28. Cortes J, Perl AE, Döhner H, et al. Quizartinib, an *FLT3* inhibitor, as monotherapy in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukaemia: an

open-label, multicentre, single-arm, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 2018;19(7):889-903. doi:10.1016/S1470-2045(18)30240-7

29. Stein EM, DiNardo CD, Pollyea DA, et al. Enasidenib in mutant *IDH2* relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2017;130(6):722-731. doi:10.1182/blood-2017-04-779405

30. Davis JR, Benjamin DJ, Jonas BA. New and emerging therapies for acute myeloid leukaemia. *Journal of Investigative Medicine*. 2018;66(8):1088-1095. doi:10.1136/jim-2018-000807

31. Hills RK, Castaigne S, Appelbaum FR, et al. Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. *The Lancet Oncology*. 2014;15(9):986-996. doi:10.1016/S1470-2045(14)70281-5

32. Uy GL, Godwin J, Rettig MP, et al. Preliminary Results of a Phase 1 Study of Flotetuzumab, a CD123 x CD3 Bispecific Dart® Protein, in Patients with Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. *Blood*. 2017;130(Suppl 1):637-637.

33. Gill S, Tasian SK, Ruella M, et al. Preclinical targeting of human acute myeloid leukemia and myeloablation using chimeric antigen receptor-modified T cells. *Blood*. 2014;123(15):2343-2354. doi:10.1182/blood-2013-09-529537

34. Sill H, Olipitz W, Zebisch A, Schulz E, Wölfler A. Therapy-related myeloid neoplasms: pathobiology and clinical characteristics: Therapy-related myeloid neoplasms. *British Journal of Pharmacology*. 2011;162(4):792-805. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01100.x

35. Gaidzik V, Döhner K. Prognostic Implications of Gene Mutations in Acute Myeloid Leukemia With Normal Cytogenetics. *Seminars in Oncology*. 2008;35(4):346-355. doi:10.1053/j.seminoncol.2008.04.005

36. Danlos F-X, Papo M, Micol J-B. L'hématopoïèse clonale: un concept émergent à la croisée des spécialités. *La Revue de Médecine Interne*. 2019;40(10):684-692. doi:10.1016/j.revmed.2019.05.005

37. Steensma DP. Clinical consequences of clonal hematopoiesis of indeterminate potential. 2018;2(22):7.
38. Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature*. 2014;506(7488):328-333. doi:10.1038/nature13038
39. Corces-Zimmerman MR, Hong W-J, Weissman IL, Medeiros BC, Majeti R. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(7):2548-2553. doi:10.1073/pnas.1324297111
40. Thomas D, Majeti R. Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood*. 2017;129(12):1577-1585. doi:10.1182/blood-2016-10-696054
41. Farge T, Saland E, de Toni F, et al. Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. *Cancer Discovery*. 2017;7(7):716-735. doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0441
42. Adane B, Ye H, Khan N, et al. The Hematopoietic Oxidase NOX2 Regulates Self-Renewal of Leukemic Stem Cells. *Cell Rep*. 2019;27(1):238-254.e6. doi:10.1016/j.celrep.2019.03.009
43. Mattes K, Vellenga E, Schepers H. Differential redox-regulation and mitochondrial dynamics in normal and leukemic hematopoietic stem cells: A potential window for leukemia therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019;144:102814. doi:10.1016/j.critrevonc.2019.102814
44. Sánchez-Aguilera A, Méndez-Ferrer S. The hematopoietic stem-cell niche in health and leukemia. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2017;74(4):579-590. doi:10.1007/s00018-016-2306-y
45. Chan W-I, Huntly BJP. Leukemia Stem Cells in Acute Myeloid Leukemia. *Seminars in Oncology*. 2008;35(4):326-335. doi:10.1053/j.seminoncol.2008.04.003
46. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 Mutations Result in a Hypermethylation Phenotype, Disrupt TET2 Function, and Impair Hematopoietic Differentiation. *Cancer Cell*. 2010;18(6):553-567.

doi:10.1016/j.ccr.2010.11.015

47. DeBerardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances*. 2016;2(5):e1600200. doi:10.1126/sciadv.1600200
48. Counihan JL, Grossman EA, Nomura DK. Cancer Metabolism: Current Understanding and Therapies. *Chemical Reviews*. 2018;118(14):6893-6923. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00775
49. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029-1033. doi:10.1126/science.1160809
50. Bose S, Le A. Glucose Metabolism in Cancer. In: Le A, ed. *The Heterogeneity of Cancer Metabolism*. Vol 1063. Cham: Springer International Publishing; 2018:3-12. doi:10.1007/978-3-319-77736-8_1
51. Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*. 2016;41(3):211-218. doi:10.1016/j.tibs.2015.12.001
52. Wilson WR, Hay MP. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2011;11(6):393-410. doi:10.1038/nrc3064
53. Dong W, Keibler MA, Stephanopoulos G. Review of metabolic pathways activated in cancer cells as determined through isotopic labeling and network analysis. *Metabolic Engineering*. 2017;43:113-124. doi:10.1016/j.ymben.2017.02.002
54. Icard P, Lincet H. A global view of the biochemical pathways involved in the regulation of the metabolism of cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2012;1826(2):423-433. doi:10.1016/j.bbcan.2012.07.001
55. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Bougioukas G, Sivridis E. Lung cancer: An organized cellular and metabolic domain. *Cancer Biology & Therapy*. 2007;6(9):1472-1475. doi:10.4161/cbt.6.9.4635
56. Anderson NM, Mucka P, Kern JG, Feng H. The emerging role and targetability of the TCA cycle in cancer metabolism. *Protein & Cell*. 2018;9(2):216-237. doi:10.1007/s13238-017-0451-1

57. Rampal R, Figueroa ME. Wilms tumor 1 mutations in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2016;101(6):672-679. doi:10.3324/haematol.2015.141796
58. Montalban-Bravo G, DiNardo CD. The role of *IDH* mutations in acute myeloid leukemia. *Future Oncology*. 2018;14(10):979-993. doi:10.2217/fo-2017-0523
59. Lu C, Ward PS, Kapoor GS, et al. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature*. 2012;483(7390):474-478. doi:10.1038/nature10860
60. Dang CV. Glutaminolysis: Supplying carbon or nitrogen or both for cancer cells? *Cell Cycle*. 2010;9(19):3884-3886. doi:10.4161/cc.9.19.13302
61. Gao P, Tchernyshyov I, Chang T-C, et al. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature*. 2009;458(7239):762-765. doi:10.1038/nature07823
62. Jin L, Alesi GN, Kang S. Glutaminolysis as a target for cancer therapy. *Oncogene*. 2016;35(28):3619-3625. doi:10.1038/onc.2015.447
63. Michalak KP, Maćkowska-Kędziora A, Sobolewski B, Woźniak P. Key Roles of Glutamine Pathways in Reprogramming the Cancer Metabolism. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015;2015:1-14. doi:10.1155/2015/964321
64. Traverso N, Ricciarelli R, Nitti M, et al. Role of Glutathione in Cancer Progression and Chemoresistance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013;2013:1-10. doi:10.1155/2013/972913
65. Park JK, Coffey NJ, Limoges A, Le A. The Heterogeneity of Lipid Metabolism in Cancer. In: Le A, ed. *The Heterogeneity of Cancer Metabolism*. Vol 1063. Cham: Springer International Publishing; 2018:33-55. doi:10.1007/978-3-319-77736-8_3
66. Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(10):763-777. doi:10.1038/nrc2222
67. Carracedo A, Cantley LC, Pandolfi PP. Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nature Reviews Cancer*. 2013;13(4):227-232. doi:10.1038/nrc3483

68. Louie SM, Roberts LS, Mulvihill MM, Luo K, Nomura DK. Cancer cells incorporate and remodel exogenous palmitate into structural and oncogenic signaling lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2013;1831(10):1566-1572. doi:10.1016/j.bbalip.2013.07.008
69. Liu Q, Luo Q, Halim A, Song G. Targeting lipid metabolism of cancer cells: A promising therapeutic strategy for cancer. *Cancer Letters*. 2017;401:39-45. doi:10.1016/j.canlet.2017.05.002
70. Maan M, Peters JM, Dutta M, Patterson AD. Lipid metabolism and lipophagy in cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018;504(3):582-589. doi:10.1016/j.bbrc.2018.02.097
71. Currie E, Schulze A, Zechner R, Walther TC, Farese RV. Cellular Fatty Acid Metabolism and Cancer. *Cell Metabolism*. 2013;18(2):153-161. doi:10.1016/j.cmet.2013.05.017
72. Ramírez de Molina A, Gallego-Ortega D, Sarmentero-Estrada J, et al. Choline kinase as a link connecting phospholipid metabolism and cell cycle regulation: Implications in cancer therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2008;40(9):1753-1763. doi:10.1016/j.biocel.2008.01.013
73. Bagnoli M, Granata A, Nicoletti R, et al. Choline Metabolism Alteration: A Focus on Ovarian Cancer. *Frontiers in Oncology*. 2016;6. doi:10.3389/fonc.2016.00153
74. Ridgway ND. The role of phosphatidylcholine and choline metabolites to cell proliferation and survival. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2013;48(1):20-38. doi:10.3109/10409238.2012.735643
75. Gibellini F, Smith TK. The Kennedy pathway-De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life*. 2010;n/a-n/a. doi:10.1002/iub.337
76. Kim H-Y, Lee K-M, Kim S-H, Kwon Y-J, Chun Y-J, Choi H-K. Comparative metabolic and lipidomic profiling of human breast cancer cells with different metastatic potentials. *Oncotarget*. 2016;7(41):67111-67128. doi:10.18632/oncotarget.11560

77. Kamata H, Hirata H. Redox Regulation of Cellular Signalling. *Cellular Signalling*. 1999;11(1):1-14. doi:10.1016/S0898-6568(98)00037-0
78. Yahata T, Takanashi T, Muguruma Y, et al. Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. *Blood*. 2011;118(11):2941-2950. doi:10.1182/blood-2011-01-330050
79. Piccoli C, D'Aprile A, Ripoli M, et al. Bone-marrow derived hematopoietic stem/progenitor cells express multiple isoforms of NADPH oxidase and produce constitutively reactive oxygen species. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007;353(4):965-972. doi:10.1016/j.bbrc.2006.12.148
80. Tothova Z, Gilliland DG. FoxO Transcription Factors and Stem Cell Homeostasis: Insights from the Hematopoietic System. *Cell Stem Cell*. 2007;1(2):140-152. doi:10.1016/j.stem.2007.07.017
81. Hole PS, Zabkiewicz J, Munje C, et al. Overproduction of NOX-derived ROS in AML promotes proliferation and is associated with defective oxidative stress signaling. *Blood*. 2013;122(19):3322-3330. doi:10.1182/blood-2013-04-491944
82. Zhou F, Shen Q, Claret FX. Novel roles of reactive oxygen species in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Journal of Leukocyte Biology*. 2013;94(3):423-429. doi:10.1189/jlb.0113006
83. Xu Q. Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood*. 2003;102(3):972-980. doi:10.1182/blood-2002-11-3429
84. Zeng Z, Samudio IJ, Zhang W, et al. Simultaneous Inhibition of PDK1/AKT and Fms-Like Tyrosine Kinase 3 Signaling by a Small-Molecule KP372-1 Induces Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis in Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Research*. 2006;66(7):3737-3746. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1278
85. Sallmyr A, Fan J, Datta K, et al. Internal tandem duplication of FLT3 (FLT3/ITD) induces increased ROS production, DNA damage, and misrepair: implications for poor prognosis in AML. *Blood*. 2008;111(6):3173-3182. doi:10.1182/blood-2007-05-092510
86. Marlein CR, Zaitseva L, Piddock RE, et al. NADPH oxidase-2 derived superoxide drives mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to leukemic

blasts. *Blood*. July 2017;blood-2017-03-772939. doi:10.1182/blood-2017-03-772939

87. Mondet J, Presti CL, Garrel C, et al. Adult patients with de novo acute myeloid leukemia show a functional deregulation of redox balance at diagnosis which is correlated with molecular subtypes and overall survival. *Haematologica*. 2019;104(9):e393-e397. doi:10.3324/haematol.2018.206821

88. Ferret Y, Boissel N, Helevaut N, et al. Clinical relevance of *IDH1/2* mutant allele burden during follow-up in acute myeloid leukemia. A study by the French ALFA group. *Haematologica*. 2018;103(5):822-829. doi:10.3324/haematol.2017.183525

89. Kreitz, Schönfeld, Seibert, et al. Metabolic Plasticity of Acute Myeloid Leukemia. *Cells*. 2019;8(8):805. doi:10.3390/cells8080805

90. Castelli G, Pelosi E, Testa U. Emerging Therapies for Acute Myelogenous Leukemia Patients Targeting Apoptosis and Mitochondrial Metabolism. *Cancers*. 2019;11(2):260. doi:10.3390/cancers11020260

91. Ward PS, Patel J, Wise DR, et al. The Common Feature of Leukemia-Associated *IDH1* and *IDH2* Mutations Is a Neomorphic Enzyme Activity Converting α -Ketoglutarate to 2-Hydroxyglutarate. *Cancer Cell*. 2010;17(3):225-234. doi:10.1016/j.ccr.2010.01.020

92. Gross S, Cairns RA, Minden MD, et al. Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *The Journal of Experimental Medicine*. 2010;207(2):339-344. doi:10.1084/jem.20092506

93. Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated *IDH1* mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 2009;462(7274):739-744. doi:10.1038/nature08617

94. Ye H, Adane B, Khan N, et al. Subversion of Systemic Glucose Metabolism as a Mechanism to Support the Growth of Leukemia Cells. *Cancer Cell*. 2018;34(4):659-673.e6. doi:10.1016/j.ccell.2018.08.016

95. Stuani L, Sabatier M, Sarry J-E. Exploiting metabolic vulnerabilities for personalized therapy in acute myeloid leukemia. *BMC Biology*. 2019;17(1). doi:10.1186/s12915-019-0670-4

96. Saito Y, Chapple RH, Lin A, Kitano A, Nakada D. AMPK Protects Leukemia-Initiating Cells in Myeloid Leukemias from Metabolic Stress in the Bone Marrow. *Cell Stem Cell*. 2015;17(5):585-596. doi:10.1016/j.stem.2015.08.019
97. Chen W-L, Wang J-H, Zhao A-H, et al. A distinct glucose metabolism signature of acute myeloid leukemia with prognostic value. *Blood*. 2014;124(10):1645-1654. doi:10.1182/blood-2014-02-554204
98. Jones CL, Stevens BM, D'Alessandro A, et al. Inhibition of Amino Acid Metabolism Selectively Targets Human Leukemia Stem Cells. *Cancer Cell*. 2018;34(5):724-740.e4. doi:10.1016/j.ccell.2018.10.005
99. Jacque N, Ronchetti AM, Larrue C, et al. Targeting glutaminolysis has antileukemic activity in acute myeloid leukemia and synergizes with BCL-2 inhibition. *Blood*. 2015;126(11):1346-1356. doi:10.1182/blood-2015-01-621870
100. Gallipoli P, Giotopoulos G, Tzelepis K, et al. Glutaminolysis is a metabolic dependency in FLT3^{ITD} acute myeloid leukemia unmasked by FLT3 tyrosine kinase inhibition. *Blood*. 2018;131(15):1639-1653. doi:10.1182/blood-2017-12-820035
101. Willems L, Jacque N, Jacquelin A, et al. Inhibiting glutamine uptake represents an attractive new strategy for treating acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013;122(20):3521-3532. doi:10.1182/blood-2013-03-493163
102. Mossmann D, Park S, Hall MN. mTOR signalling and cellular metabolism are mutual determinants in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2018;18(12):744-757. doi:10.1038/s41568-018-0074-8
103. 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):1229. doi:10.3390/cells8101229
104. Wang J, Ye W, Yan X, et al. Low expression of ACLY associates with favorable prognosis in acute myeloid leukemia. *J Transl Med*. 2019;17(1):149. doi:10.1186/s12967-019-1884-5
105. Samudio I, Harmancey R, Fiegl M, et al. Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *J Clin Invest*.

2010;120(1):142-156. doi:10.1172/JCI38942

106. Tabe Y, Saitoh K, Yang H, et al. Inhibition of FAO in AML co-cultured with BM adipocytes: mechanisms of survival and chemosensitization to cytarabine. *Sci Rep*. 2018;8(1):16837. doi:10.1038/s41598-018-35198-6

107. Picou F, Debeissat C, Bourgeais J, et al. n-3 Polyunsaturated fatty acids induce acute myeloid leukemia cell death associated with mitochondrial glycolytic switch and Nrf2 pathway activation. *Pharmacological Research*. 2018;136:45-55. doi:10.1016/j.phrs.2018.08.015

108. Shi J, Fu H, Jia Z, He K, Fu L, Wang W. High Expression of CPT1A Predicts Adverse Outcomes: A Potential Therapeutic Target for Acute Myeloid Leukemia. *EBioMedicine*. 2016;14:55-64. doi:10.1016/j.ebiom.2016.11.025

109. German NJ, Yoon H, Yusuf RZ, et al. PHD3 Loss in Cancer Enables Metabolic Reliance on Fatty Acid Oxidation via Deactivation of ACC2. *Molecular Cell*. 2016;63(6):1006-1020. doi:10.1016/j.molcel.2016.08.014

110. Stefanko A, Thiede C, Ehninger G, Simons K, Grzybek M. Lipidomic approach for stratification of acute myeloid leukemia patients. Del Poeta M, ed. *PLoS ONE*. 2017;12(2):e0168781. doi:10.1371/journal.pone.0168781

111. Stuani L, Riols F, Millard P, et al. Stable Isotope Labeling Highlights Enhanced Fatty Acid and Lipid Metabolism in Human Acute Myeloid Leukemia. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11). doi:10.3390/ijms19113325

112. Loew A, Köhnke T, Rehbeil E, Pietzner A, Weylandt K-H. A Role for Lipid Mediators in Acute Myeloid Leukemia. *IJMS*. 2019;20(10):2425. doi:10.3390/ijms20102425

113. Pabst T, Kortz L, Fiedler GM, Ceglarek U, Idle JR, Beyoğlu D. The plasma lipidome in acute myeloid leukemia at diagnosis in relation to clinical disease features. *BBA Clinical*. 2017;7:105-114. doi:10.1016/j.bbacli.2017.03.002

114. Wang Y, Zhang L, Chen W-L, et al. Rapid Diagnosis and Prognosis of *de novo* Acute Myeloid Leukemia by Serum Metabonomic Analysis. *Journal of Proteome Research*. 2013;12(10):4393-4401. doi:10.1021/pr400403p

115. Kuliszewicz-Janus M, Tuz M, Kiełbiński M, Jaźwiec B, Niedoba J, Baczyński

- S. ³¹P MRS analysis of the phospholipid composition of the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and bone marrow mononuclear cells (BMMC) of patients with acute leukemia (AL). *Cellular and Molecular Biology Letters*. 2009;14(1). doi:10.2478/s11658-008-0032-7
116. Xu M, Seneviratne AK, Schimmer AD. Phospholipid metabolism regulates AML growth and stemness. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(12):3895-3897. doi:10.18632/aging.102055
117. Seneviratne AK, Xu M, Henao JJA, et al. The Mitochondrial Transacylase, Tafazzin, Regulates AML Stemness by Modulating Intracellular Levels of Phospholipids. *Cell Stem Cell*. 2019;24(4):621-636.e16. doi:10.1016/j.stem.2019.02.020
118. Kullmann L, Krahn MP. Controlling the master-upstream regulation of the tumor suppressor LKB1. *Oncogene*. 2018;37(23):3045-3057. doi:10.1038/s41388-018-0145-z
119. Reference GH. STK11 gene. Genetics Home Reference. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/STK11>. Accessed August 18, 2020.
120. Shackelford DB, Shaw RJ. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(8):563-575. doi:10.1038/nrc2676
121. Jansen M, Ten Klooster JP, Offerhaus GJ, Clevers H. LKB1 and AMPK family signaling: the intimate link between cell polarity and energy metabolism. *Physiol Rev*. 2009;89(3):777-798. doi:10.1152/physrev.00026.2008
122. Sanchez-Cespedes M, Parrella P, Esteller M, et al. Inactivation of LKB1/STK11 is a common event in adenocarcinomas of the lung. *Cancer Res*. 2002;62(13):3659-3662.
123. Wingo SN, Gallardo TD, Akbay EA, et al. Somatic LKB1 mutations promote cervical cancer progression. *PLoS ONE*. 2009;4(4):e5137. doi:10.1371/journal.pone.0005137
124. Green AS, Chapuis N, Trovati Maciel T, et al. The LKB1/AMPK signaling pathway has tumor suppressor activity in acute myeloid leukemia through the

repression of mTOR-dependent oncogenic mRNA translation. *Blood*. 2010;116(20):4262-4273. doi:10.1182/blood-2010-02-269837

125. Zeqiraj E, Filippi BM, Deak M, Alessi DR, van Aalten DMF. Structure of the LKB1-STRAD-MO25 complex reveals an allosteric mechanism of kinase activation. *Science*. 2009;326(5960):1707-1711. doi:10.1126/science.1178377

126. Deng L, Yao P, Li L, et al. p53-mediated control of aspartate-asparagine homeostasis dictates LKB1 activity and modulates cell survival. *Nat Commun*. 2020;11(1):1755. doi:10.1038/s41467-020-15573-6

127. Zeqiraj E, Filippi BM, Goldie S, et al. ATP and MO25alpha regulate the conformational state of the STRADalpha pseudokinase and activation of the LKB1 tumour suppressor. *PLoS Biol*. 2009;7(6):e1000126. doi:10.1371/journal.pbio.1000126

128. Alessi DR, Sakamoto K, Bayascas JR. LKB1-dependent signaling pathways. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:137-163. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142702

129. Boudeau J, Baas AF, Deak M, et al. MO25alpha/beta interact with STRADalpha/beta enhancing their ability to bind, activate and localize LKB1 in the cytoplasm. *EMBO J*. 2003;22(19):5102-5114. doi:10.1093/emboj/cdg490

130. Wang H, Wang X, Xin N, et al. Live kinase B1 maintains CD34+CD38- AML cell proliferation and self-renewal. *Mol Cell Biochem*. 2017;434(1-2):25-32. doi:10.1007/s11010-017-3032-y

131. Yang M-Y, Hsiao H-H, Liu Y-C, Hsu C-M, Lin S-F, Lin P-M. Phe354Leu Polymorphism of LKB1 Is a Potential Prognostic Factor for Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. *In Vivo*. 2017;31(5):841-847. doi:10.21873/invivo.11137

132. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 2008;30(2):214-226. doi:10.1016/j.molcel.2008.03.003

133. Markley JL, Brüschweiler R, Edison AS, et al. The future of NMR-based metabolomics. *Current Opinion in Biotechnology*. 2017;43:34-40. doi:10.1016/j.copbio.2016.08.001

134. Zhang A, Sun H, Xu H, Qiu S, Wang X. Cell Metabolomics. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*. 2013;17(10):495-501. doi:10.1089/omi.2012.0090
135. Hollywood K, Brison DR, Goodacre R. Metabolomics: Current technologies and future trends. *PROTEOMICS*. 2006;6(17):4716-4723. doi:10.1002/pmic.200600106
136. Wishart DS. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2016;15(7):473-484. doi:10.1038/nrd.2016.32
137. Nagana Gowda GA, Raftery D. Can NMR solve some significant challenges in metabolomics? *Journal of Magnetic Resonance*. 2015;260:144-160. doi:10.1016/j.jmr.2015.07.014
138. Beckonert O, Coen M, Keun HC, et al. High-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues. *Nature Protocols*. 2010;5(6):1019-1032. doi:10.1038/nprot.2010.45
139. Mlynárik V. Introduction to nuclear magnetic resonance. *Analytical Biochemistry*. 2017;529:4-9. doi:10.1016/j.ab.2016.05.006
140. Dennis EA. Lipidomics joins the omics evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(7):2089-2090. doi:10.1073/pnas.0812636106
141. Fahy E, Subramaniam S, Murphy RC, et al. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res*. 2009;50(Supplement):S9-S14. doi:10.1194/jlr.R800095-JLR200
142. Quehenberger O, Armando AM, Dennis EA. High sensitivity quantitative lipidomics analysis of fatty acids in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1811(11):648-656. doi:10.1016/j.bbali.2011.07.006
143. Radu AG, Torch S, Fauvelle F, et al. LKB1 specifies neural crest cell fates through pyruvate-alanine cycling. *Sci Adv*. 2019;5(7):eaau5106. doi:10.1126/sciadv.aau5106
144. Lo Presti C, Fauvelle F, Mondet J, Mossuz P. The differential activation of metabolic pathways in leukemic cells depending on their genotype and micro-

- environmental stress. *Metabolomics*. 2020;16(1):13. doi:10.1007/s11306-020-1633-z
145. Murakami Y, Murakami C, Hoshino F, et al. Palmitic acid- and/or palmitoleic acid-containing phosphatidic acids are generated by diacylglycerol kinase α in starved Jurkat T cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2020;525(4):1054-1060. doi:10.1016/j.bbrc.2020.02.162
146. Yanagisawa K, Yasuda S, Kai M, et al. Diacylglycerol kinase α suppresses tumor necrosis factor- α -induced apoptosis of human melanoma cells through NF- κ B activation. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1771(4):462-474. doi:10.1016/j.bbalip.2006.12.008
147. Liu K, Kunii N, Sakuma M, et al. A novel diacylglycerol kinase α -selective inhibitor, CU-3, induces cancer cell apoptosis and enhances immune response. *J Lipid Res*. 2016;57(3):368-379. doi:10.1194/jlr.M062794
148. Yamaki A, Akiyama R, Murakami C, et al. Diacylglycerol kinase α -selective inhibitors induce apoptosis and reduce viability of melanoma and several other cancer cell lines. *J Cell Biochem*. 2019;120(6):10043-10056. doi:10.1002/jcb.28288
149. Takeishi K, Taketomi A, Shirabe K, et al. Diacylglycerol kinase α enhances hepatocellular carcinoma progression by activation of Ras-Raf-MEK-ERK pathway. *J Hepatol*. 2012;57(1):77-83. doi:10.1016/j.jhep.2012.02.026
150. Baldanzi G, Mitola S, Cutrupi S, et al. Activation of diacylglycerol kinase α is required for VEGF-induced angiogenic signaling in vitro. *Oncogene*. 2004;23(28):4828-4838. doi:10.1038/sj.onc.1207633
151. Mu YM, Yanase T, Nishi Y, et al. Saturated FFAs, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis in human granulosa cells. *Endocrinology*. 2001;142(8):3590-3597. doi:10.1210/endo.142.8.8293
152. Slagsvold JE, Pettersen CHH, Follestad T, Krokan HE, Schønberg SA. The antiproliferative effect of EPA in HL60 cells is mediated by alterations in calcium homeostasis. *Lipids*. 2009;44(2):103-113. doi:10.1007/s11745-008-3263-5
153. Yamagami T, Porada CD, Pardini RS, Zanjani ED, Almeida-Porada G. Docosahexaenoic acid induces dose dependent cell death in an early undifferentiated subtype of acute myeloid leukemia cell line. *Cancer Biol Ther*.

2009;8(4):331-337. doi:10.4161/cbt.8.4.7334

154. Dubois D, Fernandes S, Amiar S, et al. *Toxoplasma gondii* acetyl-CoA synthetase is involved in fatty acid elongation (of long fatty acid chains) during tachyzoite life stages. *J Lipid Res.* 2018;59(6):994-1004. doi:10.1194/jlr.M082891

155. Rak S, De Zan T, Stefulj J, Kosović M, Gamulin O, Osmak M. FTIR spectroscopy reveals lipid droplets in drug resistant laryngeal carcinoma cells through detection of increased ester vibrational bands intensity. *Analyst.* 2014;139(13):3407-3415. doi:10.1039/c4an00412d

156. Jacquel A, Luciano F, Robert G, Auberger P. Implication and Regulation of AMPK during Physiological and Pathological Myeloid Differentiation. *IJMS.* 2018;19(10):2991. doi:10.3390/ijms19102991

157. Rafter I, Gråberg T, Kotronen A, et al. Isoform-specific alanine aminotransferase measurement can distinguish hepatic from extrahepatic injury in humans. *Int J Mol Med.* 2012;30(5):1241-1249. doi:10.3892/ijmm.2012.1106

158. Green AS, Chapuis N, Lacombe C, Mayeux P, Bouscary D, Tamburini J. LKB1/AMPK/mTOR signaling pathway in hematological malignancies: from metabolism to cancer cell biology. *Cell Cycle.* 2011;10(13):2115-2120. doi:10.4161/cc.10.13.16244

159. Tiziani S, Lodi A, Khanim FL, Viant MR, Bunce CM, Günther UL. Metabolomic Profiling of Drug Responses in Acute Myeloid Leukaemia Cell Lines. Cordes N, ed. *PLoS ONE.* 2009;4(1):e4251. doi:10.1371/journal.pone.0004251

160. Suganuma K, Miwa H, Imai N, et al. Energy metabolism of leukemia cells: glycolysis versus oxidative phosphorylation. *Leukemia & Lymphoma.* 2010;51(11):2112-2119. doi:10.3109/10428194.2010.512966

161. Pei S, Minhajuddin M, Callahan KP, et al. Targeting Aberrant Glutathione Metabolism to Eradicate Human Acute Myelogenous Leukemia Cells. *Journal of Biological Chemistry.* 2013;288(47):33542-33558. doi:10.1074/jbc.M113.511170

162. Bhanot H, Reddy MM, Nonami A, et al. Pathological glycogenesis through glycogen synthase 1 and suppression of excessive AMP kinase activity in myeloid leukemia cells. *Leukemia.* 2015;29(7):1555-1563. doi:10.1038/leu.2015.46

163. Zhang X, Yang J, Chen M, et al. Metabolomics profiles delineate uridine deficiency contributes to mitochondria-mediated apoptosis induced by celastrol in human acute promyelocytic leukemia cells. *Oncotarget*. 2016;7(29). doi:10.18632/oncotarget.10286
164. Stäubert C, Bhuiyan H, Lindahl A, et al. Rewired Metabolism in Drug-resistant Leukemia Cells: A METABOLIC SWITCH HALLMARKED BY REDUCED DEPENDENCE ON EXOGENOUS GLUTAMINE. *Journal of Biological Chemistry*. 2015;290(13):8348-8359. doi:10.1074/jbc.M114.618769
165. Damm F, Thol F, Hollink I, et al. Prevalence and prognostic value of IDH1 and IDH2 mutations in childhood AML: a study of the AML–BFM and DCOG study groups. *Leukemia*. 2011;25(11):1704-1710. doi:10.1038/leu.2011.142
166. Abbas S, Lugthart S, Kavelaars FG, et al. Acquired mutations in the genes encoding IDH1 and IDH2 both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Blood*. 2010;116(12):2122-2126. doi:10.1182/blood-2009-11-250878
167. Zellner M, Gerner C, Munk Eliassen M, et al. Glutamine starvation of monocytes inhibits the ubiquitin–proteasome proteolytic pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2003;1638(2):138-148. doi:10.1016/S0925-4439(03)00062-0
168. Nwosu ZC, Battello N, Rothley M, et al. Liver cancer cell lines distinctly mimic the metabolic gene expression pattern of the corresponding human tumours. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2018;37(1). doi:10.1186/s13046-018-0872-6
169. DiNardo CD, Propert KJ, Loren AW, et al. Serum 2-hydroxyglutarate levels predict isocitrate dehydrogenase mutations and clinical outcome in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013;121(24):4917-4924. doi:10.1182/blood-2013-03-493197
170. Janin M, Mylonas E, Saada V, et al. Serum 2-Hydroxyglutarate Production in *IDH1* - and *IDH2* -Mutated De Novo Acute Myeloid Leukemia: A Study by the Acute Leukemia French Association Group. *Journal of Clinical Oncology*. 2014;32(4):297-305. doi:10.1200/JCO.2013.50.2047
171. Lagunas-Rangel FA, Chávez-Valencia V. FLT3–ITD and its current role in

acute myeloid leukaemia. *Medical Oncology*. 2017;34(6). doi:10.1007/s12032-017-0970-x

172. Heath EM, Chan SM, Minden MD, Murphy T, Shlush LI, Schimmer AD. Biological and clinical consequences of NPM1 mutations in AML. *Leukemia*. 2017;31(4):798-807. doi:10.1038/leu.2017.30

173. Bansal A, Simon MC. Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. *The Journal of Cell Biology*. 2018;217(7):2291-2298. doi:10.1083/jcb.201804161

174. Yang P, Ebbert JO, Sun Z, Weinshilboum RM. Role of the Glutathione Metabolic Pathway in Lung Cancer Treatment and Prognosis: A Review. *Journal of Clinical Oncology*. 2006;24(11):1761-1769. doi:10.1200/JCO.2005.02.7110

175. Viswanath P, Radoul M, Izquierdo-Garcia JL, et al. Mutant IDH1 gliomas downregulate phosphocholine and phosphoethanolamine synthesis in a 2-hydroxyglutarate-dependent manner. *Cancer & Metabolism*. 2018;6(1). doi:10.1186/s40170-018-0178-3

176. Elkhaled A, Jalbert L, Constantin A, et al. Characterization of metabolites in infiltrating gliomas using *ex vivo* ¹H high-resolution magic angle spinning spectroscopy: CHARACTERIZATION OF METABOLITES IN INFILTRATING GLIOMAS. *NMR in Biomedicine*. 2014;27(5):578-593. doi:10.1002/nbm.3097

177. Jalbert LE, Elkhaled A, Phillips JJ, et al. Metabolic Profiling of IDH Mutation and Malignant Progression in Infiltrating Glioma. *Scientific Reports*. 2017;7(1). doi:10.1038/srep44792

178. Shah T, Wildes F, Penet M-F, et al. Choline kinase overexpression increases invasiveness and drug resistance of human breast cancer cells. *NMR in Biomedicine*. 2010;23(6):633-642. doi:10.1002/nbm.1510

179. Sousa CM, Biancur DE, Wang X, et al. Pancreatic stellate cells support tumour metabolism through autophagic alanine secretion. *Nature*. 2016;536(7617):479-483. doi:10.1038/nature19084

180. Vettore L, Westbrook RL, Tennant DA. New aspects of amino acid metabolism in cancer. *Br J Cancer*. 2020;122(2):150-156. doi:10.1038/s41416-019-0620-5

181. Salzer W, Bostrom B, Messinger Y, Perissinotti AJ, Marini B. Asparaginase activity levels and monitoring in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*. 2018;59(8):1797-1806. doi:10.1080/10428194.2017.1386305

Annexe

Lettre à l'éditeur

Haematologica. 2019 Sep; 104(9): e393–e397.

doi: 10.3324/haematol.2018.206821

PMCID: PMC6717570

PMID: 30819920

Adult patients with de novo acute myeloid leukemia show a functional deregulation of redox balance at diagnosis which is correlated with molecular subtypes and overall survival

Julie Mondet, **Caroline Lo Presti**, Catherine Garrel, Kristina Skaare, Clara Mariette, Sylvain Carras, Sophie Park, Martin Carré, Claude-Eric Bulabois, Lysiane Molina, Rémy Gressin, Anne Thiebaut, Stéphane Courby, Nuria Socoro-Yuste, Patrice Faure, Anne Mc Leer-Florin, Jean-Yves Cahn, and Pascal Mossuz.

Adult patients with *de novo* acute myeloid leukemia show a functional deregulation of redox balance at diagnosis which is correlated with molecular subtypes and overall survival

The balance between the production of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant systems, which defines the redox status (a state of oxidative stress if ROS are in excess), is a regulator of normal and malignant hematopoiesis. ROS status, sometimes linked with

molecular abnormalities, has pleiomorphic effects on the initiation and progression of acute myeloid leukemia (AML), but also on sensitivity to chemotherapy.¹⁻⁵ For example, variability in the levels of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NOX), a ROS producer, influences the efficacy of AML induction therapy, improving complete remission when more ROS are generated.⁶ The two major sources of ROS production are the mitochondria and NOX activity, which itself contributes to increasing levels of ROS in more than 60% of AML.⁷ However, AML cells also have a singular mito-

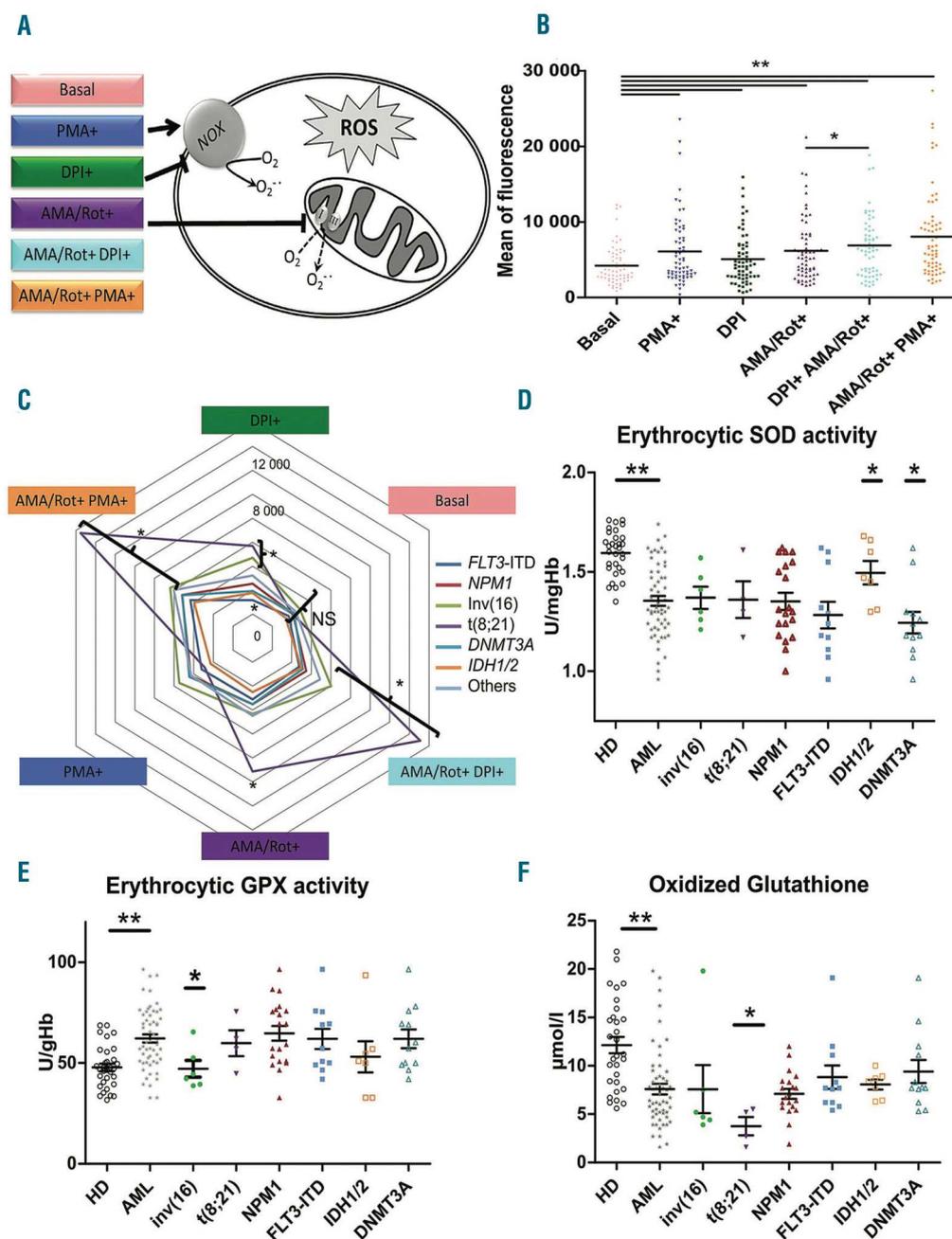


Figure 1. Reactive oxygen species profiles and antioxidant markers of leukemic cells. (A) Schema of reactive oxygen species (ROS) modulators stimulating or inhibiting NADPH oxidase and mitochondria used in the *ex vivo* ROS assays. (B) ROS profiles showing the effects of different ROS modulators in blast cells from bone marrow. Statistical analysis: Wilcoxon test for paired samples. (C) Spider chart of ROS profiles according to leukemic abnormalities. Colored lines represent leukemic abnormalities. Note that ROS profiles from t(8;21), inv(16) patients showed more variability in ROS production after the addition of modulators. "Others" refers to acute myeloid leukemia (AML) that did not express any of the listed abnormalities. (D) Distribution of erythrocytic superoxide dismutase activity at diagnosis in healthy donors (HD) and AML patients according to genetic abnormalities. (E) Distribution of erythrocytic glutathione peroxidase activity in HD and AML patients according to genetic abnormalities. (F) Distribution of oxidized glutathione in HD and AML patients according to genetic abnormalities. (B, D, E, F) * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate; DPI: diphenyleneiodonium; AMA: antimycin A; Rot: rotenone; NOX: NADPH oxidase; SOD: superoxide dismutase; GPX: glutathione peroxidase.

chondrial organization with increased mitochondrial mass but a low spare reserve capacity that renders them susceptible to oxidative stressors.⁶ Finally, ROS concentrations can also be modulated by the microenvironment⁹ and by the antioxidant system.⁷

In this prospective study (registered as EudraCT: 2013 A00762-43), we determined the redox status of 84 adult patients with newly diagnosed AML through characterization of ROS production profiles at diagnosis in both the non-leukemic and leukemic compartments. We developed an original *ex vivo* ROS assay using mitochondrial and/or NOX modulators (Figure 1A). In order to construct ROS profiles, six different ROS conditions were studied after labeling with 10 μ M dihydroethidium (ThermoFisher Scientific): ROS production at basal state (phosphate-buffered saline vehicle) and after the addition of one or more ROS modulators [phorbol myristate acetate (PMA), antimycin A/rotenone (AMA/Rot), and/or diphenyleneiodonium (DPI)]. Candidate populations were targeted with CD45⁺ antibody (Becton Dickinson Biosciences), and side scatter (Online Supplementary Figure S1). Mean dihydroethidium fluorescence of each cell population was measured. The patients' characteristics are presented in Online Supplementary Table S1.

ROS production in leukemic cells from peripheral blood was well correlated with that in bone marrow blasts (Online Supplementary Table S2) and with leukocytosis ($r=0.508$, $P<0.001$). ROS production was increased by PMA, a NOX stimulator, and by the complex III and complex I inhibitors AMA/Rot ($P<0.001$ and $P<0.001$, respectively, compared to basal levels) (Figure 1B). Surprisingly, DPI, an inhibitor of NOX, stimulated ROS production in leukemic cells (basal vs. DPI, $P=0.002$ and AMA/Rot⁺DPI⁺ vs. AMA/Rot⁺DPI⁻, $P=0.012$). In fact, DPI has been shown to induce mitochondrial superoxide production through mitochondrial complex I.^{10,11}

No difference in basal ROS levels was observed according to molecular abnormalities (Figure 1C), although AML4 and AML5 expressed higher basal levels of ROS ($P=0.009$) (Online Supplementary Figure S2) as previously observed.¹² However, leukemic cells from patients with *FLT3*-internal tandem duplication (ITD) showed significantly lower ROS production when stimulated with DPI than did leukemic cells from patients without *FLT3*-ITD ($P<0.05$). In contrast, core binding factor (CBF)-AML cells comprising inv(16) and t(8;21) showed significantly higher levels of ROS production in several conditions (AMA/Rot⁺DPI⁺, AMA/Rot⁺PMA⁺, and DPI⁺ ($P=0.002$, $P=0.024$, and $P=0.028$, respectively). Hence, the CBF subgroup appeared highly sensitive to mitochondrial stress, possibly reflecting the poor stability of mitochondrial membrane permeability and a low mitochondrial threshold for apoptosis. In contrast, the weak response of the *FLT3*-ITD subtype to DPI suggests a 'mitochondrial resistance' to chemotherapy-induced apoptosis through oxidative stress. Levels of ROS production at baseline did not differ significantly between European LeukemiaNet prognostic groups (data not shown). Altogether, ROS production profiles based on the functional evaluation of NOX and mitochondria were more discriminative markers of AML heterogeneity than was basal ROS production.

We investigated whether non-tumoral cells from AML patients had ROS profiles equivalent to those from 65 healthy donors used as controls. ROS production at basal state was significantly higher in neutrophils from AML patients than in those from healthy donors ($P<0.001$) (Figure 2A). However, neutrophils from AML patients

exhibited a lower capacity to increase NOX-dependent ROS production in response to PMA ($P=0.001$) and AMA/Rot⁺PMA⁺ ($P<0.001$). Lymphocytes and monocytes from leukemic patients also displayed significantly lower ROS production than that of the corresponding cells from healthy donors whatever the ROS condition used ($P<0.001$) (Figure 2B,C). Thus, a dysregulated non-tumoral compartment might influence redox levels in the leukemic compartment.

Next, we investigated antioxidant and lipid peroxidation markers at diagnosis and their relationship with

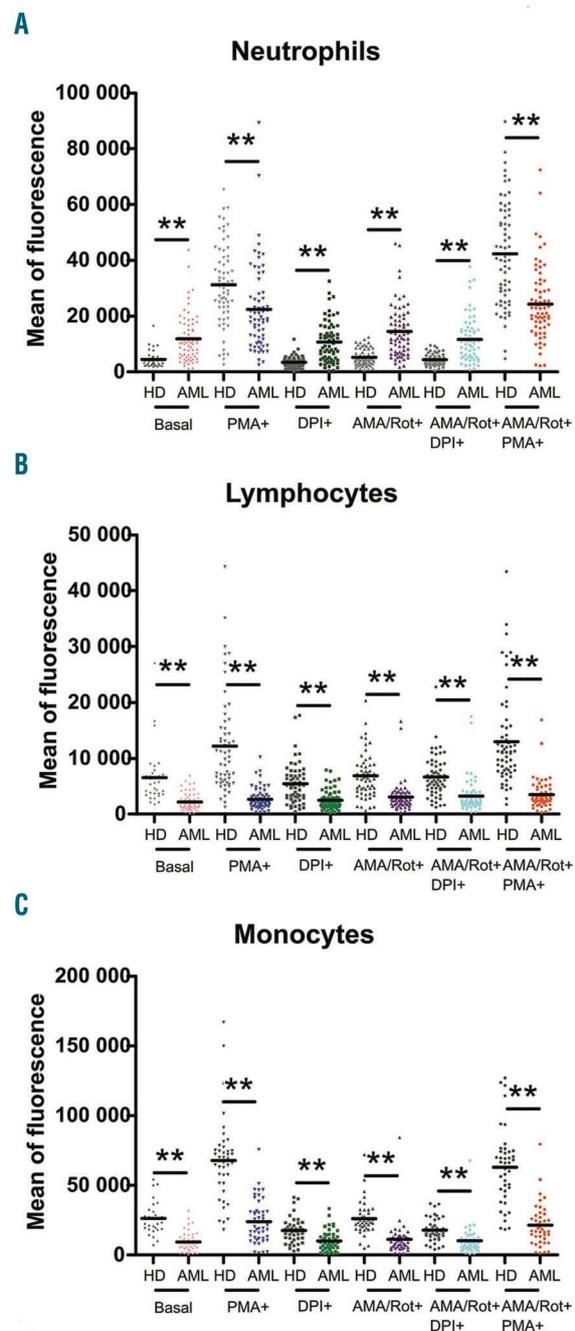


Figure 2. Reactive oxygen species profiles of non-leukemic cells from healthy donors and patients with acute myeloid leukemia. (A) At baseline, levels of reactive oxygen species (ROS) in neutrophils from patients with acute myeloid leukemia (AML) were higher than those in neutrophils from healthy donors. However, neutrophils from AML patients were less reactive to phorbol 12-myristate 13-acetate stimulation. In contrast, in lymphocytes (B) and monocytes (C) from AML patients, ROS production was lower whatever the ROS conditions. ** $P<0.01$. HD: healthy donors; PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate; DPI: diphenyleneiodonium; AMA: antimycin A; Rot: rotenone.

molecular subtypes (for methodological details see the *Online Supplementary File*). The activity of erythrocytic superoxide dismutase was significantly lower in AML patients than in healthy donors ($P<0.001$) (Figure 1D). However, *IDH* and *DNMT3A* mutations were associated with, respectively, increased and decreased superoxide dismutase activity ($P<0.05$). Conversely, erythrocytic glutathione peroxidase activity was significantly increased in AML patients ($P<0.001$) (Figure 1E). Among molecular subtypes, patients with *inv(16)* presented significantly reduced erythrocytic glutathione peroxidase activity ($P<0.01$). Overall, total glutathione was decreased in AML ($P<0.001$), as were both oxidized glutathione ($P<0.001$) (Figure 1F) and reduced glutathione ($P<0.001$),

as previously described in CD34⁺ AML cells.¹³ Interestingly, oxidized glutathione was significantly reduced in t(8;21) patients ($P<0.05$) leading to a higher glutathione redox ratio ($P<0.05$). The thiol ratio was also lower in AML patients than in healthy donors ($P<0.001$) and a significant decrease in total thiols was observed in patients with *FLT3-ITD* ($P<0.01$), *NPM1* mutation ($P<0.05$) and *DNMT3A* mutation ($P=0.059$) compared to patients without these mutations. Finally, we observed a significant reduction in lipid peroxidation, assessed by a malondialdehyde assay, in patients with *inv(16)* ($P<0.05$). However, antioxidant markers at diagnosis did not differ significantly between European LeukemiaNet prognostic classes (*data not shown*). Altogether, we showed that CBF-

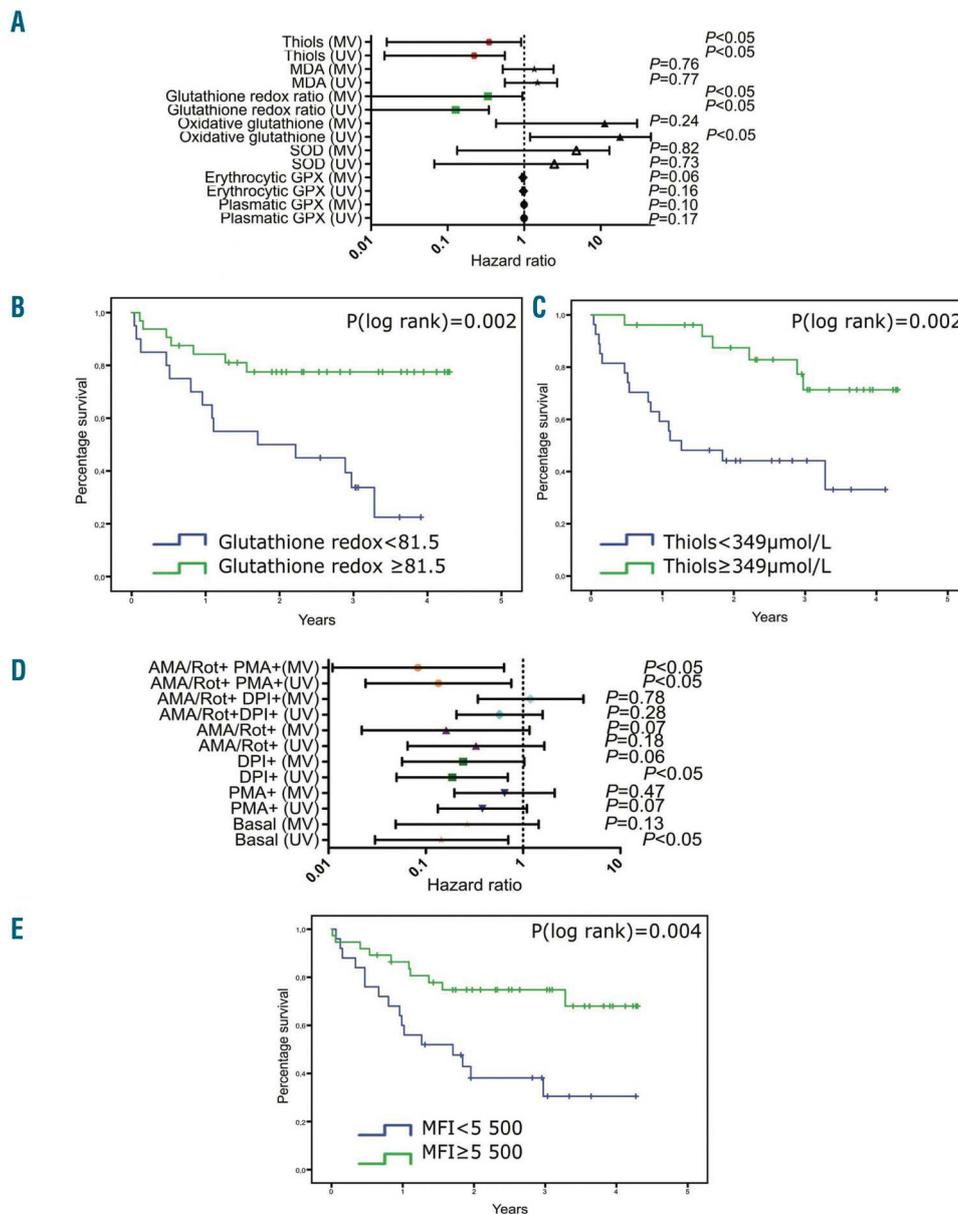


Figure 3. Prognostic value of antioxidant markers and leukemic reactive oxygen species profiles. (A) Forest plot representing the risk of death (with hazard ratios and 95% confidence intervals) according to antioxidant markers and malondialdehyde levels. (B) Kaplan-Meier survival curves of patients with acute myeloid leukemia (AML) receiving chemotherapy according to the cut-off for reduced/oxidative glutathione ratio (< vs. ≥81.5). (C) Kaplan-Meier survival curves of AML patients receiving chemotherapy according to the cut-off for thiol levels (< or ≥349 μmol/L). (D) Forest plot representing the risk of death (with hazard ratios and 95% confidence intervals) according to reactive oxygen species (ROS) production by leukemic cells from bone marrow exposed to different ROS modulators (log-transformed variables). (E) Kaplan-Meier survival curves of AML patients receiving chemotherapy according to the cut-off for mean fluorescence intensity (MFI) in response to ROS modulators (< vs. ≥5,500). High levels of MFI were predictive of survival ($P=0.004$). MV: multivariate analysis; UV: univariate analysis; MDA: malondialdehyde; SOD: superoxide dismutase; GPX: glutathione peroxidase; AMA: antimycin A; Rot: rotenone; PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate; DPI: diphenyleneiodonium.

AML presented fewer markers of oxidative stress, with lower oxidized glutathione for t(8;21) AML and lower malondialdehyde levels for inv(16) AML, in contrast to the *FLT3*-ITD, *NPM1*, and *DNMT3A* subtypes of AML which showed lower levels of thiols. These data suggest that oncogenic mutations could also affect the antioxidant system and, together with alterations in ROS production, promote the proliferation of leukemic cells.

Next, we explored whether redox status at diagnosis influences survival. The statistical methods are described in the *Online Supplementary File*. We observed that the reduced/oxidized glutathione ratio at diagnosis was significantly higher in survivors than in non-survivors ($P=0.002$) and in non-relapsed patients *versus* relapsed patients ($P<0.05$). Furthermore, oxidized glutathione levels at diagnosis were lower in survivors than in non-survivors ($P=0.017$). Multivariate analysis including age, the 2017 European LeukemiaNet stratification and leukocyte counts confirmed that an increase in the reduced/oxidized glutathione ratio was an independent marker of longer survival [hazard ratio (HR)=0.055, 95% confidence interval (95% CI): 0.003-0.951, $P=0.04$] (Figure 3A). Moreover, an increase in thiol levels was also significantly associated with a lower risk of death and relapse (HR=0.12, 95% CI: 0.016-0.911, $P=0.04$ and HR=0.07, 95% CI: 0.007-0.753 $P=0.028$, respectively). Based on receiver operating characteristic curve analysis, we calculated a threshold for both the reduced/oxidized glutathione ratio and thiol levels. Patients whose glutathione redox ratio was ≥ 81.5 or patients whose thiol concentration was ≥ 349 $\mu\text{mol/L}$ at diagnosis had significantly higher survival rates ($P=0.002$ and $P=0.002$, respectively) (Figure 3B,C).

Furthermore, we showed that ROS production at baseline was significantly correlated with overall survival in univariate analysis (from bone marrow samples, HR=0.14, 95% CI: 0.03-0.7, $P=0.02$) although this was not confirmed in multivariate analysis (from bone marrow and peripheral blood samples, HR=0.27, 95% CI: 0.05-1.45, $P=0.13$ and HR=0.35, 95% CI: 0.12-1.03, $P=0.06$, respectively) (Figure 3D). However, leukemic cell ROS measured after incubation with modulators could be an independent prognostic marker of survival. Indeed, the risk of death was significantly decreased in patients with the highest levels of DPI-induced ROS (in bone marrow and peripheral blood HR=0.169, 95% CI: 0.041-0.694, $P=0.014$ and HR=0.26, 95% CI: 0.075-0.90, $P=0.035$, respectively, in univariate analysis). An increase in DPI-dependant ROS in bone marrow samples was also associated with longer relapse-free survival and event-free survival in multivariate analysis (HR=0.1, 95% CI: 0.02-0.49, $P=0.005$, and HR=0.17, 95% CI: 0.04-0.66, $P=0.01$, respectively). Interestingly, increased ROS production by leukemic cells under AMA/Rot*PMA* stimulation was significantly associated with longer survival in both univariate and multivariate analyses (HR=0.14, 95% CI: 0.02-0.76, $P=0.02$ and HR=0.08, 95% CI: 0.01-0.64, $P=0.02$, respectively). Moreover, higher ROS production under AMA/Rot*PMA* stimulation was significantly associated with longer relapse-free survival and event-free survival in multivariate analysis (HR=0.028, 95% CI: 0.003-0.278, $P=0.002$ and HR=0.12, 95% CI: 0.023-0.73, $P=0.02$, respectively). These results were confirmed in peripheral blood (for overall survival and event-free survival: HR=0.28, 95% CI: 0.1-0.813, $P=0.019$ and HR=0.33, 95% CI: 0.13-0.84, $P=0.02$, respectively). Finally, we identified a threshold using receiver operating characteristic curves in which patients whose blasts from bone marrow or blood at diagnosis produced $\geq 5,500$ ROS

in response to AMA/Rot and PMA had a significantly higher survival rate ($P=0.004$) (Figure 3E).

Our approach underlines the importance of functional NOX and mitochondria in chemosensitivity and confirms that mitochondrial fitness is critical to prognosis. We suggest that blast cells resistant to mitochondria and NOX stress are more resistant to chemotherapy (or at least include subclones resistant to chemotherapy), probably because in these patients chemotherapy failed to induce efficient ROS-mediated apoptosis of leukemic cells. Farge *et al.* demonstrated that chemoresistant leukemic cells displayed a high OXPFO signature characterized by active polarized mitochondria with no loss of mitochondrial membrane potential after cytarabine-treatment.¹⁴ We hypothesize that our patients resistant to mitochondrial and NOX stress could be similar to those with high OXPFO and may be good candidates for ROS/mitochondria targeted therapy. For example, mitochondrial complex I inhibitors such as metformin can induce an energy shift from high OXPFO to low OXPFO (the so-called Pasteur effect) and improve the sensitivity of *FLT3*-ITD AML to cytarabine. Finally, the fact that both NOX and mitochondria-dependent ROS production were associated with better survival argues for cooperation between ROS producers. Indeed, superoxide generated from leukemic NOX2 drives mitochondrial transfer from stromal cells.⁹

In conclusion, our study showed that AML patients had a dysregulated redox balance linked to their molecular status, involving leukemic cells, non-tumoral cells and the antioxidant system, which play a major role in the prognosis of patients.

Julie Mondet,^{1,2} Caroline Lo Presti,^{2,3} Catherine Garrel,⁴ Kristina Skaare,⁵ Clara Mariette,⁶ Sylvain Carras,⁷ Sophie Park,^{2,6} Martin Carré,⁶ Claude-Eric Bulabois,⁶ Lysiane Molina,⁶ Rémy Gressin,⁶ Anne Thiebaut,⁶ Stéphane Courby,⁶ Nuria Socoro-Yuste,⁸ Patrice Faure,⁴ Anne Mc Leer-Florin,^{1,2} Jean-Yves Cahn^{2,6} and Pascal Mossuz^{2,3}

¹Molecular Pathology Laboratory, Grenoble Alpes University (UGA) Hospital, Grenoble, France; ²Institute for Advanced Biosciences, UGA, L'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1209, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) 5309, Grenoble, France; ³Laboratory of Hematology, UGA Hospital, Grenoble, France; ⁴Department of Biochemistry, UGA Hospital, Grenoble, France; ⁵Techniques de l'Ingénierie Médicale et de la Complexité Informatique et Applications - Informatique, Mathématiques et Applications Grenoble (TIMC-IMAG), CNRS, UGA, La Tronche, France; ⁶Department of Hematology, UGA Hospital, Grenoble, France; ⁷Department of Hematology, University Hospital, Lyon, France; ⁸Pharmacy Department, Hospital Clinic de Barcelona, Barcelona, Spain

Acknowledgments: the authors would like to thank Dr Alison Foote (Grenoble Alpes University Hospital) for very substantial critical editing of the manuscript.

Correspondence: PASCAL MOSSUZ - pmossuz@chu-grenoble.fr
JULIE MONDET - jmondet@chu-grenoble.fr
doi:10.3324/haematol.2018.206824

Information on authorship, contributions, and financial & other disclosures was provided by the authors and is available with the online version of this article at www.haematologica.org.

References

- Sallmyr A, Fan J, Datta K, et al. Internal tandem duplication of *FLT3* (*FLT3*/ITD) induces increased ROS production, DNA damage, and misrepair: implications for poor prognosis in AML. *Blood*. 2003;111(6):3173-3182.
- Sinenko SA, Hung T, Moroz T, et al. Genetic manipulation of AML1-ETO-induced expansion of hematopoietic precursors in a *Drosophila*

- model. *Blood*. 2010;116(22):4612–4620.
3. Ward PS, Patel J, Wise DR, 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):225–234.
 4. Lagadinou ED, Sach A, Callahan K, et al. BCL-2 Inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells. *Cell Stem Cell*. 2013;12(3):329–341.
 5. Zhou J, Bi C, Cheong L-L, et al. The histone methyltransferase inhibitor, DZNep, up-regulates TXNIP, increases ROS production, and targets leukemia cells in AML. *Blood*. 2011;118(10):2830–2839.
 6. Megías-Vericat JE, Montesinos P, Herrero MJ, et al. Impact of NADPH oxidase functional polymorphisms in acute myeloid leukemia induction chemotherapy. *Pharmacogenomics J*. 2018;18(2):301–307.
 7. Hole PS, Zabkiewicz J, Munje C, et al. Overproduction of NOX-derived ROS in AML promotes proliferation and is associated with defective oxidative stress signaling. *Blood*. 2013;122(19):3322–3330.
 8. Sriskanthadevan S, Jeyaraju DV, Chung TE, et al. AML cells have low spare reserve capacity in their respiratory chain that renders them susceptible to oxidative metabolic stress. *Blood*. 2015;125(13):2120–2130.
 9. Marlein CR, Zaitseva I, Piddock RE, et al. NADPH oxidase-2 derived superoxide drives mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to leukemic blasts. *Blood*. 2017;130(14):1649–1660.
 10. Riganti C, Gazzano E, Polimeni M, Costamagna C, Bosia A, Chigo D. Diphenyleneiodonium inhibits the cell redox metabolism and induces oxidative stress. *J Biol Chem*. 2004;279(46):47726–47731.
 11. Kučera J, Binó L, Štefková K, et al. Apocynin and diphenyleneiodonium induce oxidative stress and modulate PI3K/Akt and MAPK/Erk activity in mouse embryonic stem cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;20167409196.
 12. Aurelius J, Thorén FB, Akhiani AA, et al. Monocytic AML cells inactivate antileukemic lymphocytes: role of NADPH oxidase/gp91(phox) expression and the PARP-1/PAR pathway of apoptosis. *Blood*. 2012;119(24):5832–5837.
 13. Pei S, Minhajuddin M, Callahan KP, et al. Targeting aberrant glutathione metabolism to eradicate human acute myelogenous Leukemia Cells. *J Biol Chem*. 2013;288(47):33542–33558.
 14. Farge T, Saland E, de Toni F, 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):716–735.

Résumé

Le métabolisme des cellules cancéreuses est fortement perturbé et dérégulé dans les cancers. Plusieurs exemples illustrent ce phénomène, notamment la reprogrammation métabolique décrite dans l'effet Warburg, les dérégulations fonctionnelles de certaines voies métaboliques telles que l'augmentation de la production de ROS dans les cellules cancéreuses, ou la mise en évidence d'oncométabolites liés à des mutations acquises telles que les mutations IDH1/2 qui entraînent la production d'un métabolite directement associé au processus leucémique dans les LAM. Afin de caractériser les reprogrammations métaboliques associées au processus leucémique, nous avons analysé par une approche HRMAS les métabolites produits par différentes lignées cellulaires leucémiques représentant différents sous types de LAM (génotype et phénotype différents). Dans ce modèle, nous avons montré que chaque type de lignée présentait un métabolisme particulier à l'état basal, témoin d'une signature métabolique différente selon la nature de la lignée. En situation de stress métabolique (culture en milieu sans sérum), toutes ces lignées développent des mécanismes d'adaptation de leur métabolisme à la carence en nutriments. En particulier, il existe une signature commune caractérisée par la surexpression de métabolites de la voie des phospholipides et de régulation du stress oxydant au bout de 24h de culture en milieu sans sérum. Grâce à ces mécanismes d'adaptation les cellules leucémiques retrouvent au bout de 48h, une viabilité supérieure à 95% et un profil métabolique quasi-identique aux conditions normales. Ces résultats montrent que les cellules leucémiques développent des mécanismes communs de survie, impliquant notamment des dérégulations du métabolisme des lipides, qui leur permettent de continuer à proliférer en situation de stress métabolique. D'autres conditions expérimentales ont été testées, notamment en condition de carence en glucose afin d'explorer la piste de la dérégulation de certains acides aminés comme l'alanine dans ces lignées. De plus, l'étude quantitative et qualitative des acides gras dans les LAM via une approche lipidomique révèle une adaptation similaire des profils lipidomiques des lignées dans les mêmes conditions de privation en sérum précédemment testées. En parallèle, dans une étude sur 54 patients au diagnostic de LAM, nous avons confirmé par l'approche HRMAS qu'il existait chez les patients LAM des différences de profil métabolique en fonction du sous-type de LAM. Nous avons également montré que ces signatures métaboliques étaient significativement corrélées aux sous-groupes pronostiques cytogénétiques, à la réponse au traitement par chimiothérapie et à la survie des patients. Nous montrons notamment que les métabolites surexprimés chez les patients de mauvais pronostic sont retrouvés surexprimés également chez les patients réfractaires au traitement. L'analyse de ces métabolites montre le rôle particulier de plusieurs voies métaboliques dans le pronostic des LAM : i) la dérégulation de la synthèse de 2-hydroxyglutarate associée aux mutations de l'enzyme IDH1/2, ii) la dérégulation du métabolisme des phospholipides, retrouvant une surexpression de phospholipides dans les plasmas de patients de pronostic défavorable, et iii) la surexpression de la synthèse de certains acides aminés chez les patients chimiorésistants, suggérant une implication de la voie de signalisation LKB1/AMPK.