



**HAL**  
open science

# Caractéristiques métaboliques et moléculaires des leucémies aiguës myéloïdes (LAM) avec mutations isocitrate déshydrogénase (IDH)

Amaury Bongers

► **To cite this version:**

Amaury Bongers. Caractéristiques métaboliques et moléculaires des leucémies aiguës myéloïdes (LAM) avec mutations isocitrate déshydrogénase (IDH). Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASL090 . tel-04339280

**HAL Id: tel-04339280**

**<https://theses.hal.science/tel-04339280v1>**

Submitted on 13 Dec 2023

**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.

# Caractéristiques métaboliques et moléculaires des leucémies aiguës myéloïdes (LAM) avec mutations isocitrate déshydrogénase (IDH)

*Metabolic and molecular characteristics of acute myeloid leukemia  
(AML) with isocitrate dehydrogenase (IDH) mutations*

## Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°582, Cancérologie : biologie-médecine-santé (CBMS)  
Spécialité de doctorat : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie  
Graduate School : Life Sciences and health. Référent : Faculté de médecine

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Dynamique moléculaire de la  
transformation hématopoïétique (Université Paris-Saclay, INSERM)** sous la  
direction du Dr. **Virginie PENARD-LACRONIQUE**.

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 12 Décembre 2022, par

**Amaury BONGERS**

THESE DE DOCTORAT

NNT : 2022UPASL090

## Composition du Jury

<b>Stéphane PROST</b> DR, CEA	Président
<b>Paulo DE SEPULVEDA</b> CRCN, INSERM	Rapporteur
<b>Cyril BROCCARDO</b> DR2, INSERM	Rapporteur
<b>Valérie DARDALHON</b> CRCN, INSERM	Examinatrice

# REMERCIEMENTS

---

## **À Monsieur le Docteur Stéphane Prost,**

Je tenais à vous remercier d'avoir accepté de présider mon jury de thèse mais également d'avoir pu bénéficier de votre expertise dans mon domaine de recherche. Je vous suis aussi reconnaissant pour votre bienveillance le jour de la soutenance ainsi que dans les échanges que nous avons pu avoir en amont.

## **À Messieurs les Docteurs Paulo De Sepulveda et Cyril Broccardo,**

Je vous remercie chaleureusement d'avoir accepté d'évaluer mon travail ainsi que pour vos rapports constructifs pour améliorer ce manuscrit. Je suis très honoré de pouvoir bénéficier de votre expertise pour juger mon projet de thèse et du temps que vous avez consacré à ce dernier.

## **À Madame le Docteur Valérie Dardalhon,**

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse ainsi que votre présence dans mon comité de suivi. Je vous suis très reconnaissant de pouvoir bénéficier de votre expertise pour juger l'évolution de ce travail.

## **À Madame le Docteur Virginie Penard-Lacronique,**

Je voudrais vous remercier pour m'avoir accueilli dans votre équipe et m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse après mon poste d'ingénieur d'études à Gustave Roussy. Je vous suis également reconnaissant de m'avoir permis de découvrir la recherche à travers ce projet très varié et stimulant. Enfin, je vous remercie pour votre gentillesse et votre humanité dont vous avez fait preuve pendant ces 4 ans de collaboration.

**Laure**, je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi durant ces 4 ans. Tu as été un support technique, scientifique et moral incroyable. Tu es une super formatrice et grâce à toi j'ai appris énormément de choses. J'ai adoré partager ton bureau pendant une partie de ma thèse (même si je n'avais pas le droit de me faire craquer le cou), toutes nos discussions longues et variées. Tes « paf », tes « mille mercis », ta bonne humeur et ton rire vont beaucoup me manquer. Merci d'avoir écouté mes longues plaintes même quand je n'attendais pas de retour mais juste une oreille attentive. Je suis également heureux d'avoir trouvé une personne aussi têtue que moi, pour ne pas dire plus... Je te souhaite le meilleur dans les années à venir professionnellement mais également personnellement avec ta petite famille.

**Nicolas et Alexandra**, je suis content d'avoir pu faire votre connaissance et que nous ayons fait partie du même groupe. Je vous souhaite beaucoup de courage pour la thèse ainsi que pour la suite de vos carrières respectives.

**Seb**, merci pour tous tes conseils sur les ChIP, les WB et tes compétences bioinfo que j'ai souvent mises à contribution. J'ai aimé le temps passé à discuter avec toi durant les incubations, les repas ou dans les couloirs le soir. Je garderai longtemps en mémoire les manip en chambre froide, toi en teeshirt et moi en blouse et doudoune... J'étais aussi content d'être presque sûr de trouver ton bureau ouvert les jours fériés ou le weekend. Je te souhaite le meilleur dans ton postdoc et espère te croiser un jour à nouveau.

**Michela, Michaël, Amina, Véro**, merci pour tous ces moments de potins partagés dans le bureau du fond qui commençaient souvent par mon traditionnel « toc toc toc » et qui se finissait avec Michaël qui arrivait en courant en ayant loupé le début. Ce sont des moments qui comptent pour le moral et pour la cohésion d'équipe.

**Christel**, merci de m'avoir toujours laissé ta porte ouverte que ce soit pour parler de sciences ou autre.

Merci également à l'équipe 2 pour tous les bons moments partagés : **Zakia, Julie, Marie, Mélanie, Maroussia, Fabien, Elie, Alexandre**.

**Paule**, je te remercie pour toute l'énergie que tu mets pour gérer nos commandes mais aussi pour ton rire, ta positivité et nos discussions dans ton bureau.

## **Au service de pharmacologie de Gustave Roussy,**

J'ai eu l'opportunité de travailler dans ce service pendant 6 mois en attendant le début de ma thèse et ainsi développer mes connaissances en chimie analytique. Je tenais à remercier tous ceux que j'ai pu croiser et avec qui j'ai aimé les moments partagés : **Lionel, Atmane, Vianney, Julia, Clémence, David, Cynthia**. Pour ceux encore présents dans le service, je voulais vous remercier pour les innombrables dosages ou validation de 2HG que vous avez pu réaliser pour mon projet de thèse ainsi que ces longs moments de discussions lorsque je venais déposer mes échantillons.

Pour finir, je tiens à remercier plus particulièrement et très chaleureusement le **Docteur Sophie Broutin**. Je te remercie d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi ainsi que tout ce que tu as pu m'apporter techniquement et scientifiquement lors de ces 6 mois de collaboration. Je tiens également sincèrement à te remercier pour ta disponibilité, tes conseils, ton extrême gentillesse et tes encouragements pendant cette thèse. J'ai toujours apprécié nos repas partagés (même après le départ de Constance) et je suis ravi que nos chemins se soient croisés. Avec les liens que tu as pu tisser avec Constance, je sais que nous continuerons à nous voir en dehors de Gustave Roussy pour partager des verres Rue Mouffetard.

Merci aux personnes de Gustave Roussy qui sont devenues de véritables amis et qui m'ont apporté leurs soutiens, leurs expériences et leurs précieux conseils pendant toute cette thèse. **Charlotte et Laëtitia**, merci de m'avoir convié à vos jeudis « filles » avec Constance, c'était une véritable bouffée d'air frais, essentielle à la réussite de nos thèses. Merci aussi pour tous les restos, apéros et soirées qu'on a pu partager avec **JB** et **Flo**. **Marco et Manon**, les barbecues, les Spritz, le voyage à Rome mais surtout les anecdotes sur les péripéties de Marco ont égayé de nombreuses journées. Je suis heureux que la thèse m'ait permis de tous vous rencontrer.

Mes amis de toujours, mes témoins : **Arnaud, Stella, Nj, Arthur, Cécile, Paulv et Angélique**... Merci d'avoir été présents dans les bons comme dans les mauvais moments, merci d'avoir toujours été disponibles pour moi, de m'avoir écouté, merci de m'avoir aidé à prendre confiance en moi et d'avoir été fiers de mon parcours. Je vous suis reconnaissant d'avoir pris le soin de tester ma résistance à l'alcool pendant nos weekends à Pau ou Bordeaux et ce malgré l'avancée de ma thèse. La distance et le temps n'ont aucun impact sur l'amitié qui nous unit.

**À Papa, Maman et Olivier**, je n'ai pas assez de mots pour vous remercier de m'avoir soutenu, accompagné, poussé à aller jusqu'au bout mais surtout d'avoir été fiers de moi. Merci de m'avoir toujours fait confiance dans mes choix même si le chemin n'a pas toujours été simple. Je vous dois en partie cette réussite.

À mes frères et sœurs : **Emma, Nils, Aloïs, Tolia, Samuel et Siena**, je vous remercie d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir permis de me changer les idées lorsqu'on a pu passer du temps ensemble en famille. Les repas dominicaux, les soirées ou les weekends m'ont énormément apporté dans l'accomplissement de ce travail.

Au reste de ma famille, **grands-parents, oncles et tantes, cousins et cousines**, je vous remercie aussi du soutien et de l'intérêt que vous avez porté à mon projet. Je vous remercie aussi d'avoir été présent pour certains le jour de ma soutenance. Partager des moments avec vous a toujours été important pour moi et m'a donné l'énergie nécessaire pour avancer.

**À mon épouse Constance**, je ne pense pas qu'il y ait de mots pour remercier une personne qui partage ma vie depuis 13 ans et qui m'a soutenu, encouragé, poussé, challengé, épaulé sans relâche avant ou pendant cette thèse. Merci d'avoir toujours cru en moi et mes capacités même quand j'en doutais. Grâce à nos projets de thèse assez proches, tu m'as énormément apporté techniquement mais surtout scientifiquement. Tu n'as jamais hésité à m'apporter toute l'aide que tu pouvais durant mon parcours et avoir pu t'observer durant ta thèse m'a énormément appris sur différents aspects. Je voudrais aussi te remercier d'avoir été si fière de mon avancée et de ma réussite. À nous, les inséparables qui seront bientôt 3. Mon succès, c'est le tien, c'est le nôtre.

# SOMMAIRE

---

<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>1</b>
<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>4</b>
<b>ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>5</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>8</b>
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	<b>9</b>
1.1. <i>LES LEUCÉMIES AIGUËS MYÉLOÏDES</i> .....	10
1.1.1. Système hématopoïétique .....	10
1.1.2. Les leucémies aiguës myéloïdes .....	11
1.1.2.1. Épidémiologie et diagnostic.....	11
1.1.2.2. Anomalies génétiques des LAM.....	12
1.1.2.3. Hématopoïèse clonale et étape pré-leucémique.....	14
1.1.2.4. Cellules souches leucémiques.....	16
1.1.2.5. Dérégulation des mécanismes de contrôle de la méthylation/déméthylation des cytosines	18
1.2. <i>ALTÉRATIONS DU MÉTABOLISME DANS LES LAM</i> .....	19
1.2.1. Métabolisme : généralités .....	19
1.2.2. Dépendance à la glycolyse des LAM.....	22
1.2.3. Dépendance au métabolisme mitochondrial des LAM.....	24
1.2.4. Dépendance au métabolisme des acides gras.....	27
1.2.4.1. Anabolisme des acides gras.....	27
1.2.4.2. Catabolisme des acides gras.....	28
1.2.5. Dépendance au métabolisme des acides aminés des LAM .....	29
1.2.6. Dépendance à la voie mTORC1 des LAM .....	32
1.3. <i>Les leucémies aiguës myéloïdes avec mutation IDH</i> .....	34
1.3.1. Enzymes isocitrate déshydrogénase.....	35
1.3.1.1. Propriétés enzymatiques.....	35
1.3.1.2. Couplage du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire.....	38
1.3.1.3. Les multiples sources et fonctions de l'αKG .....	42
1.3.1.3.1. Fonction antioxydante.....	43
1.3.1.3.2. Co-substrat de nombreuses dioxygénases cellulaires .....	44
1.3.1.3.3. Rôle dans l'inflammation .....	45
1.3.2. Mutations des gènes <i>IDH</i> .....	45
1.4. <i>Conséquences des mutations IDH</i> .....	48
1.4.1. Altérations épigénétiques liées aux mutations <i>IDH</i> .....	48
1.4.1.1. Méthylation de l'ADN.....	48
1.4.1.2. Méthylation des histones .....	50
1.4.1.3. Réparation de l'ADN.....	51
1.4.1.4. Adaptation à l'hypoxie .....	53
1.4.1.5. Maturation des collagènes.....	55
1.4.1.6. Épissage de l'ARN.....	56
1.4.2. Altérations métaboliques liées aux mutations <i>IDH</i> .....	57
1.4.3. Thérapies des LAM avec mutations <i>IDH</i> .....	59
1.4.3.1. Traitements conventionnels.....	59
1.4.3.1.1. Chimiothérapie intensive .....	59
1.4.3.1.2. Agents hypométhylants.....	59
1.4.3.2. Thérapies ciblées.....	60
1.5. <i>MÉTABOLISME DES ACIDES AMINÉS BRANCHÉS</i> .....	62
1.5.1. BCAT1 et hématopoïèse normale ou pathologique .....	67
1.5.2. BCAT1 et cellules neurales .....	68

<b>2. OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE.....</b>	<b>69</b>
<b>3. RESULTATS .....</b>	<b>71</b>
<b>4. DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....</b>	<b>72</b>
4.1. <i>DISCUSSION</i> .....	73
4.2. <i>CONCLUSIONS</i> .....	84
<b>5. BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>87</b>



## RÉSUMÉ

---

La leucémie aiguë myéloïde (LAM) est une maladie hétérogène sur le plan moléculaire qui se caractérise par l'accumulation de progéniteurs/précurseurs myéloïdes présentant des capacités de survie et de prolifération accrues et un blocage de différenciation. Les mutations somatiques affectant les gènes *isocitrate déshydrogénase (IDH) 1 et 2* sont présentes dans 20-25% des LAM. Ces gènes codent pour une même fonction du cycle de Krebs, i.e., la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en alpha-cétoglutarate ( $\alpha$ KG), dans la mitochondrie (IDH2) ou dans le cytosol et le peroxyosome (IDH1). Cette réaction s'accompagne d'une conversion du coenzyme nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme oxydée NADP<sup>+</sup> en forme réduite NADPH. Les enzymes IDH mutantes convertissent l' $\alpha$ KG en un stéréoisomère de forme D du 2-hydroxyglutarate (D-2HG). Il a été montré que le métabolite D-2HG inhibe de manière compétitive des dioxygénases cellulaires dépendantes de l' $\alpha$ KG, parmi lesquelles des histones déméthylases et les membres de la famille des 5-méthylcytosine hydroxylases TET, contribuant ainsi au blocage de la différenciation myéloïde.

L'une des conséquences fonctionnelles des anomalies *IDH* est la diminution du niveau intracellulaire d' $\alpha$ KG, dont on suppose qu'elle affecte des processus biologiques variés. L' $\alpha$ KG est un co-substrat d'un grand nombre d'enzymes. Parmi elles, les transaminases dépendantes de l' $\alpha$ KG BCAT, qui contrôlent la première étape du métabolisme des acides aminés à chaîne ramifiée (ou branched-chain amino acids, BCAA), correspondant à la leucine, l'isoleucine et la valine ; cette réaction interconvertit l' $\alpha$ KG et le glutamate.

Nous avons identifié un changement métabolique inattendu dans les cellules primaires de LAM exprimant une mutation *IDH2*, qui permet la production de leucine (sens anabolique de la voie BCAA), alors que le catabolisme de la leucine caractérise les cellules de LAM ne portant pas de mutation *IDH2 (IDH2m)*. L'anabolisme de la leucine est associé à une surexpression du gène *BCAT1*, par la levée d'un mécanisme de répression transcriptionnelle dépendant de la marque épigénétique H3K27me3. La perte d'expression (sh-RNA) ou d'activité (inhibiteurs) de *BCAT1* diminue fortement la croissance des cellules de LAM *IDH2m*, *in vitro* et dans un modèle de xénogreffe. Nous observons également que cette inhibition s'accompagne d'une différenciation granulomonocytaire partielle marquée par l'acquisition de marqueurs de ces lignages. De plus, nous avons identifié une connexion fonctionnelle entre les activités de BCAT1, du complexe mTORC1 et du facteur de transcription CCAAT enhancer binding protein alpha (CEBP $\alpha$ ) ; ce dernier est un régulateur majeur de la granulopoïèse et participe au contrôle des processus de prolifération/différenciation dans les progéniteurs/précurseurs myéloïdes. Notre étude révèle une caractéristique métabolique singulière des cellules LAM *IDH2m*, qui régule les processus de prolifération et différenciation cellulaire en faisant fonctionner la voie BCAA en sens inverse.

## ABSTRACT

---

Acute myeloid leukemia (AML) is a molecularly heterogeneous disease characterized by the accumulation of myeloid progenitors/precursors with increased survival and proliferation capacities and a differentiation block. Somatic mutations in *isocitrate dehydrogenase (IDH) 1 and 2* genes are present in 20-25% of AML. These genes encode for the same function of the TCA cycle, i.e., the oxidative decarboxylation of isocitrate to alpha-ketoglutarate ( $\alpha$ KG), in the mitochondria (IDH2) or in the cytosol and peroxisome (IDH1), this reaction is accompanied by the conversion of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP)<sup>+</sup> to NADPH. Mutant IDH enzymes reduce  $\alpha$ KG to the D stereoisomer of 2-hydroxyglutarate (D-2HG). D-2HG has been demonstrated to competitively inhibit  $\alpha$ KG-dependent dioxygenases, among them histone demethylases and members of the 5-methylcytosine hydroxylases TET family, contributing to the block of myeloid differentiation.

Besides, one of the functional consequences of *IDH* abnormalities is a decreased  $\alpha$ KG intracellular level, assumed to have wide-range biological effects.  $\alpha$ KG is an obligatory co-substrate for a large class of enzymes. Among them, the  $\alpha$ KG-dependent branched chain amino transaminases (BCAT) 1 and 2 catalyze the reversible transamination of branched-chain amino acids (BCAA, corresponding to leucine, isoleucine, and valine) to produce branched-chain  $\alpha$ -ketoacids, in a reaction that interconverts  $\alpha$ KG and glutamate.

We have identified an unanticipated metabolic shift toward production of leucine, in mutant *IDH2* AML cells while leucine catabolism hallmarks their wild-type counterparts. In these cells, leucine anabolism was associated to the up-regulation of *BCAT1* gene by breaking a H3K27me<sub>3</sub>-dependent negative regulatory mechanism due to the *IDH2* mutation. Knockdown of *BCAT1* expression (sh-RNA) or activity (inhibitors) strongly affected mutant *IDH2* AML cells growth in culture and in a xenografted model and resulted in partial cellular differentiation marked by the acquisition of granulomonocytic markers. We further identified a functional connection between BCAT1, mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) and translation of the CCAAT enhancer binding protein alpha (CEBP $\alpha$ ) transcription factor, a master regulator of granulopoiesis that participates in the proliferation-differentiation switch in myeloid progenitor/precursor cells. Our study reveals a metabolic feature of mutant *IDH2* AML, that regulate cellular proliferation and impact differentiation by running the BCAA pathway in reverse.

## ABRÉVIATIONS

---

$\alpha$ -KIC :  $\alpha$ -ketoisocaproate  
 $\alpha$ -KIV :  $\alpha$ -ketoisovalerate  
 $\alpha$ KG : alpha-kétoglutarate  
 $\alpha$ -KGDH : alpha-kétoglutarate déshydrogénase  
 $\alpha$ -KMV :  $\alpha$ -keto- $\beta$ -methylvalerate  
ADI: Arg deiminase  
ADP : adénosine diphosphate  
ALDH3A2 : aldehyde dehydrogenase 3 family member A2  
ARGase : argininase  
ARNT : aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator  
ATM : ataxia telangectasia mutated  
ATP : adénosine triphosphate  
ASXL1 : additional sex combs like 1  
BCAT : branched-chain aminotransferase  
BCKA : branched-chain keto acid  
BCKD : branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase complex  
BCL2 : B-cell lymphoma 2  
BCOR : BCL6 corepressor  
Bid : BH3 interacting domain  
CAT : catalase  
CAT-1 : cationic amino acid transporter 1  
CAT-2B : cationic amino acid transporter 2B  
CD98hc : CD98 heavy chain  
CEBPA : CCAAT enhancer-binding protein alpha  
Chk2 : checkpoint kinase 2  
CHIP : hématopoïèse clonale de potentiel indéterminée  
CLP : progéniteurs communs lymphoïdes  
CMP : progéniteurs communs myéloïdes  
CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone  
C-P4H : collagen prolyl-4-hydroxylase  
CR : complete remission  
CS : citrate synthase  
CSH : cellule souche hématopoïétique  
CSL : cellule souche leucémique  
CT2 : carnitine transporter 2  
CTCF : CCCTC-binding factor  
Cys : cystéine  
D-2HG : 2-hydroxyglutarate de forme D  
DHO : dihydroorotate  
DHOD : dihydroorotate dehydrogenase  
DNMT3A : DNA methyltransferase 3 alpha  
EBF1 : early B-cell transcription factor 1  
EED : embryonic ectoderm development  
ELN : european leukemia network  
EZH2 : enhancer of zeste homolog 2

FABP4 : fatty acid binding protein 4  
FADH<sub>2</sub> : flavine adénine dinucléotide  
FASN : fatty acid synthase  
FIH : factor inhibiting HIF  
FH : fumarate hydratase  
FLT3 : fms-Like tyrosine kinase 3  
FLT3-ITD : fms-like tyrosine kinase 3 with internal tandem duplication  
FoxO : Forkhead O  
FTO : fat mass and obesity-associated protein  
G6P : glucose 6 phosphate  
G6PDH : glucose 6 phosphate dehydrogenase  
GATA 2 : GATA binding protein 2  
GBM : glioblastome  
GDH : glutamate déshydrogénase  
Gln : glutamine  
GLS : glutaminase  
GLUT : Glucose Transporter  
GMP : progéniteurs granuleux/macrophage  
GPX4 : glutathione peroxydase 4  
GS : glutamine synthase  
GSH : glutathion réduit  
GSH-Px : glutathion peroxydase  
HIF-1 $\alpha$  : hypoxia inductible factor 1 subunit alpha  
HK1 : hexokinase 1  
HK2 : hexokinase 2  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène  
HDAC : histone deacetylase  
HDR : homology directed repair  
HRE : hypoxia-responsive elements  
HSL : hormono-sensitive lipase  
IDH : isocitrate déshydrogénase  
IDH1 : isocitrate déshydrogénase 1  
IDH2 : isocitrate déshydrogénase 2  
JAK2 : janus kinase 2  
JHDM : Jumonji-domain Histone Demethylases  
KDM1A : lysine demethylase 1A  
KDM6A : lysine demethylase 6A  
KMT2A : lysine N-méthyltransférase 2A  
m1a : 1-méthyladénine  
m3c : 3-méthylcytosine  
MCT1 : monocarboxylic acid transporter 1  
MDH : malate déshydrogénase  
MDM2 : murine double minute 2  
MEP : progéniteurs érythro/mégacaryocytaire  
METTL3 : methyltransferase 3, N6-Adenosine-Methyltransferase Complex Catalytic Subunit  
NPM1 : nucleophosmin 1  
NRF2 : nuclear factor erythroid-2-related factor 2

OAA : oxaloacétate  
OXPHOS : oxidative phosphorylation  
PARP : poly(ADP-ribose) polymérase  
PC : pyruvate carboxylase  
PDH : pyruvate déshydrogénase  
PEP : phosphoenolpyruvate  
PHD : prolyl hydroxylase  
PHF6 : PHD finger protein 6  
PKM1 : pyruvate kinase muscle 1  
PKM2 : pyruvate kinase muscle 2  
Plod : procollagen-lysine 2-oxoglutarate 5-dioxygenase  
PLP : pyridoxal-5'-phosphate  
PPAR $\gamma$  : peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$   
PPAR $\delta$  : peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$   
PPM1D : protein phosphatase, Mg<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup> dependent 1D  
PPP : pentose-phosphate  
PRC2 : polycomb repressive complex 2  
RNS : reactive nitrogen species  
R/R : rechute ou réfractaire  
RONS reactive oxygene and nitrogen species  
ROS : reactive oxygene species  
RUNX1 : runt-related transcription factor 1  
SALL4A : spalt like transcription factor 4 A  
SCD1 : stearoyl-CoA desaturase 1  
SDH : succinate déshydrogénase  
SDHA : succinate déshydrogénase A  
SF3B1 : splicing Factor 3B subunit 1  
SLAM : signaling lymphocyte activation molecule  
SMD : syndrome myélodysplasique  
SOD : superoxyde dismutase  
SRSF2 : serine and arginine rich splicing factor 2  
STAG2 : stromal antigen 2  
TCGA : the cancer genome atlas  
TET2 : ten-eleven-translocation 2  
TP53 : tumor protein 53  
TNF  $\alpha$  : tumor necrosis factor alpha  
U2AF1 : U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1  
VAF : variant allele frequency  
VDR : vitamin D receptor  
VLCAD : very long-chain acyl-CoA dehydrogenase  
VHL : von-Hippel Lindau  
WT1 : wilm's tumor 1  
ZRSR2 : zinc finger CCCH-Type RNA binding Motif And serine/arginine rich 2

## LISTE DES FIGURES

---

<b>Figure 1</b> : Différenciation hématopoïétique .....	11
<b>Figure 2</b> : Paysage mutationnel des LAM de novo .....	13
<b>Figure 3</b> : Évolution clonale au cours de la LAM .....	15
<b>Figure 4</b> : Représentation schématique de l'effet Warburg.....	20
<b>Figure 5</b> : Schéma simplifié des voies du métabolisme cellulaire importantes pour la physiopathologie de la LAM.....	21
<b>Figure 6</b> : La suppression d'enzymes contrôlant la glycolyse aérobie module le métabolisme du glucose et affecte spécifiquement les populations cellulaires hématopoïétiques et leucémiques.....	24
<b>Figure 7</b> : Le métabolisme mitochondrial peut être ciblé dans les cellules LAM par des inhibiteurs pharmacologiques .....	25
<b>Figure 8</b> : Les cibles médicamenteuses du métabolisme de la Gln dans les LAM....	31
<b>Figure 9</b> : Contrôle de la traduction par mTORC1.....	33
<b>Figure 10</b> : Anomalies <i>IDH</i> et pathologies humaines .....	35
<b>Figure 11</b> : Réactions catalysées par les enzymes IDH .....	36
<b>Figure 12</b> : Enzyme IDH2.....	38
<b>Figure 13</b> : Cycle de Krebs et chaîne respiratoire .....	39
<b>Figure 14</b> : Processus biologiques associés aux activités des enzymes IDH.....	41
<b>Figure 15</b> : Métabolisme des formes D et L du 2HG .....	47
<b>Figure 16</b> : Déméthylation active de l'ADN .....	49
<b>Figure 17</b> : Mécanismes de réparation de l'ADN impactés par les mutations IDH ..	52
<b>Figure 18</b> : Les métabolites du cycle de Krebs régulent l'activité des complexes transcriptionnels HIF.....	55
<b>Figure 19</b> : Conséquences des mutations IDH .....	57
<b>Figure 20</b> : Structure des acides aminés branchés .....	62
<b>Figure 21</b> : Métabolisme des BCAA .....	65
<b>Figure 22</b> : Expression de MYC dans 3 lignées hématopoïétiques invalidées pour BCAT1 .....	78
<b>Figure 23</b> : Interconnexion des activités BCAT1 et MYC dans les cellules primaires de LAM.....	79
<b>Figure 24</b> : Expression de E2F7 dans les blastes IDH2wt et IDH2m .....	80
<b>Figure 25</b> : Expression de BCAT1 dans les cellules hématopoïétiques.....	85

---

# **1. Introduction**

---

## 1.1. LES LEUCÉMIES AIGÜES MYÉLOÏDES

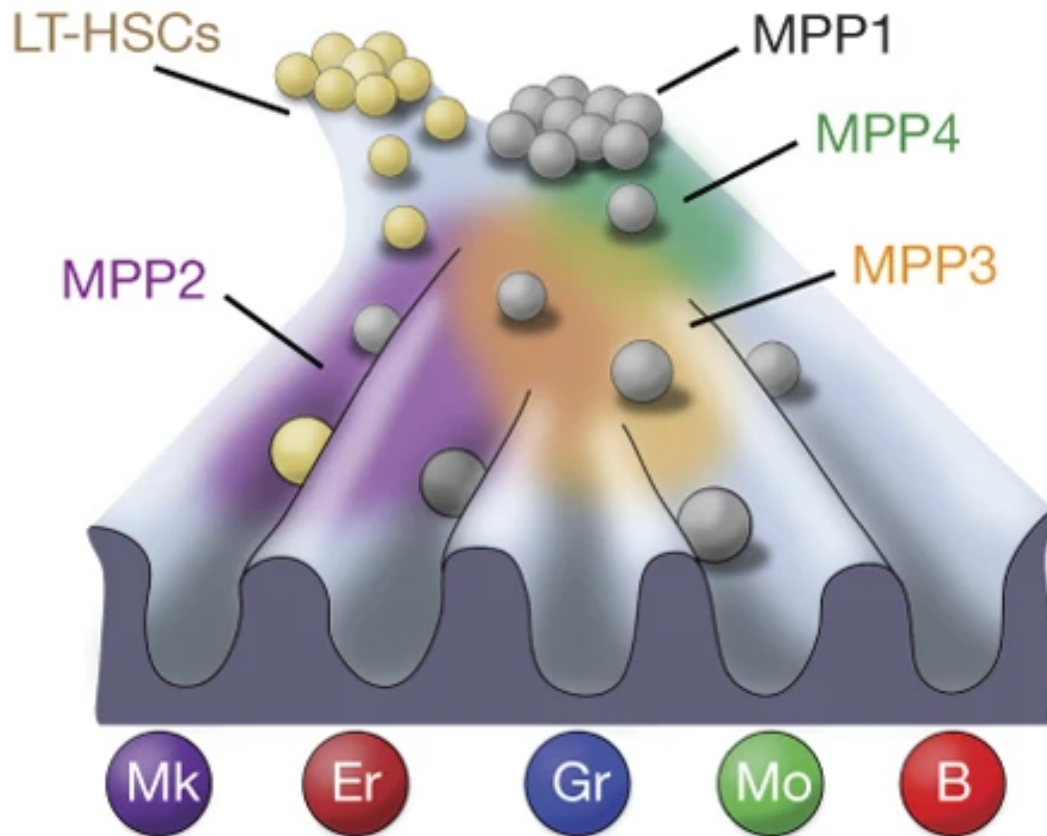
### 1.1.1. Système hématopoïétique

L'hématopoïèse est un processus biologique permettant la production de l'ensemble des cellules du système sanguin. En 1961, le concept de cellule souche hématopoïétique (CSH) a été proposé par Till et McCulloch, après leurs études pionnières sur la régénération du système hématopoïétique *in vivo*. Après transplantation d'un nombre limité de cellules de moelle osseuse (MO) à des souris receveuses, ces auteurs ont observé la formation de colonies cellulaires dans la rate des animaux receveurs. L'analyse de ces colonies a révélé qu'une sous-population de cellules originaires du donneur présentait deux caractéristiques remarquables : une capacité de générer plusieurs types de cellules myéloïdes et une capacité à s'auto-répliquer. Ces découvertes ont introduit deux des critères de définition des CSH : la multipotence et l'autorenouvellement<sup>1</sup>. Depuis, l'hématopoïèse est décrite comme un système hiérarchique avec, en son sommet, les CSH capables d'engendrer l'ensemble des lignées hématopoïétiques.

Les technologies de séquençage à haut débit sur cellule unique, ont permis de définir l'hématopoïèse comme un processus hautement flexible et graduel, qui s'apparente à un continuum<sup>2</sup>. Il a été mis en évidence des destins communs lymphoïdes et myéloïdes par le biais des progéniteurs multipotents à amorçage lymphoïde (LMPP) qui restent possibles jusqu'à un stade plus avancé de la différenciation<sup>3</sup>, ainsi qu'une subdivision du compartiment des MPP en sous-populations distinctes<sup>4</sup>. Des analyses de la population CSH démontrent une certaine hétérogénéité transcriptionnelle, suggérant que l'engagement en différenciation et le devenir cellulaire se détermine de manière précoce, dès le stade de CSH<sup>2,5</sup>. Il est commun d'utiliser une subdivision du compartiment des cellules LSK (LIN-Kit+Sca1+) en 5 sous-populations, sur la base de l'expression des marqueurs de surface CD150, CD34, CD48 et CD135 ; deux autres marqueurs de la famille signaling lymphocyte activation molecule (SLAM), CD229 et CD244, peuvent aussi distinguer les CSH et les progéniteurs multipotents (ou multipotent progenitors, MPP) des progéniteurs restreints. Cette subdivision reflète des caractéristiques fonctionnelles objectivées *in vivo* et *in vitro* et propose l'existence de fractions CSH (LT-HSC), MPP1 (ST-HSC), MPP2, MPP3 et MPP4 (aussi appelés LMPP)<sup>4</sup>. Les fractions HSC, MPP1 et MPP2 montrent des capacités de différenciation multipotente mais se distinguent par leur capacité d'auto-renouvellement et de prolifération. Un biais de différenciation est observé pour la fraction MPP3 vers les



lignées myéloïdes tandis que la lignée lymphoïde émerge pour partie de la fraction MPP4. Les MPP2 semblent quant à eux produire principalement la lignée mégacaryocytaire et présentent une capacité de différenciation restreinte<sup>7</sup>. De plus, dans ce modèle une fraction des LT-HSC pourrait directement se différencier en progéniteur mégacaryocytaire sans passer par les différents intermédiaires du compartiment MPP (**Figure 1**).



**Figure 1** : Différenciation hématopoïétique

LT-HSC : cellules souches hématopoïétiques à long terme, MPP : progéniteurs multipotents, Mk : progéniteurs mégacaryocytaires, Er : érythroblastes, Gr : granulocytes, Mo : monocytes, B : progéniteurs B. Issue de Rodriguez-Fraticelli *et al.*, Nature, 2018.

### 1.1.2. Les leucémies aiguës myéloïdes

#### 1.1.2.1. Épidémiologie et diagnostic

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont définies par l'expansion clonale de précurseurs/progéniteurs myéloïdes ayant complètement ou partiellement perdu leurs capacités de différenciation et acquis des propriétés anormales de prolifération et de survie.

Ces cellules appelées « blastes » s'accumulent dans la MO, le sang et d'autres organes, cette accumulation empêchant l'hématopoïèse normale de se réaliser.

Les LAM sont les formes de leucémie les plus fréquentes de l'adulte avec une incidence de 3 à 8 cas pour 100 000 adultes par an et à travers le monde mais qui augmente avec l'âge pouvant atteindre jusqu'à 9 à 17 cas pour 100 000 adultes à partir de 65 ans<sup>8</sup>. L'âge médian au diagnostic est de 70 ans<sup>9</sup> et la survie à 5 ans est estimée à 10% chez les sujets âgés de 60 ans et plus<sup>10</sup>.

Le diagnostic de ces pathologies s'appuie sur différents examens biologiques. Dans un premier temps, les LAM sont suspectées par une numération sanguine mettant en évidence une cytopénie. Une analyse morphologique des cellules sanguines par un myélogramme est indispensable pour identifier les blastes et diagnostiquer la maladie. La présence de 20% de blastes dans la MO ou le sang identifie la LAM. L'immunophénotypage des blastes n'est pas nécessaire au diagnostic mais il est utile pour confirmer l'origine myéloïde de la leucémie aiguë, définir son sous-type et identifier les thérapies ciblées potentielles<sup>11</sup>. La classification French - American - British (FAB) a évolué, en prenant compte des altérations cytogénétiques et génétiques qui caractérisent les blastes.

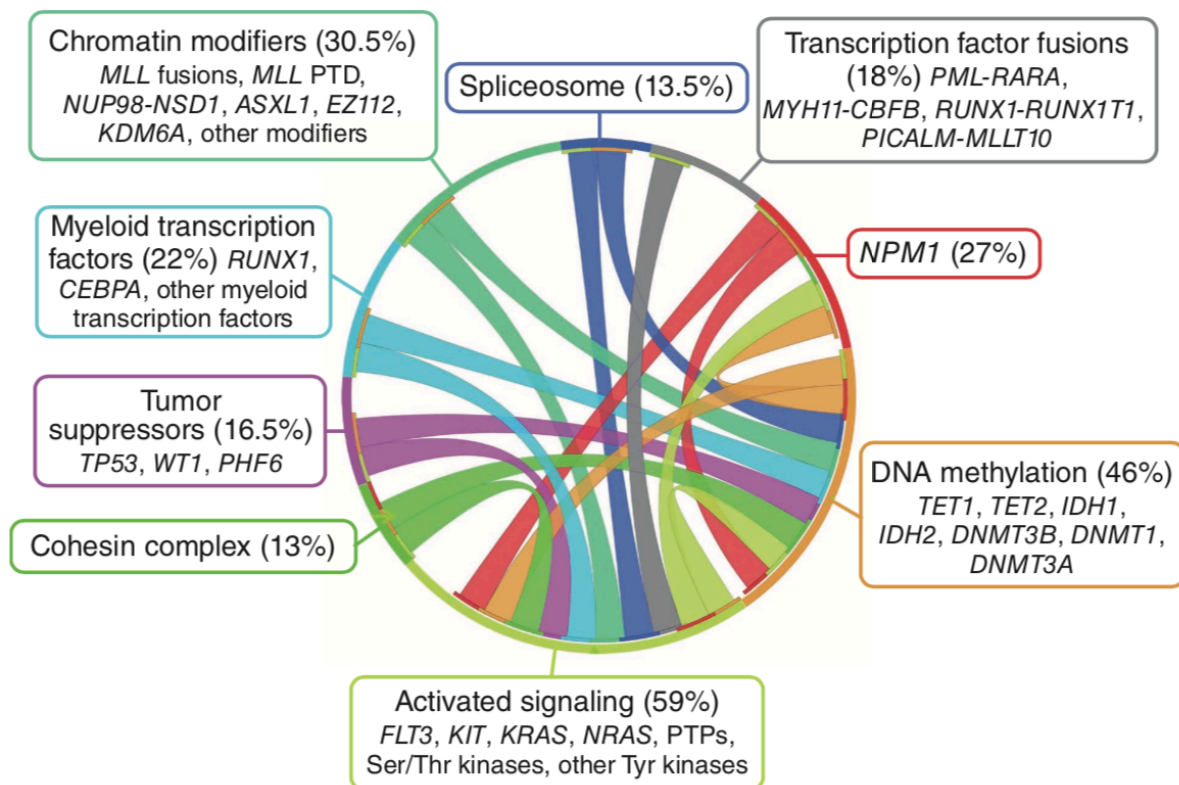
#### *1.1.2.2. Anomalies génétiques des LAM*

Les LAM sont caractérisées par un ensemble d'anomalies moléculaires et cytogénétiques récurrentes qui ont conduit à des classifications cliniques visant à stratifier les patients en sous-groupes pronostics spécifiques<sup>12</sup>, conditionnant les stratégies thérapeutiques à mettre en place<sup>13</sup>. La présence d'une anomalie touchant les gènes *Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3)*, *runt-related transcription factor 1 (RUNX1)*, *additional sex combs like 1 (ASXL1)* ou *tumor protein 53 (TP53)* est plutôt un facteur de mauvais pronostic sur la survie globale des patients, tandis que la présence d'une mutation affectant les gènes *nucleophosmin 1 (NPM1)* ou *CCAAT enhancer-binding protein alpha (CEBPA)* est plutôt un facteur de bon pronostic sur la survie globale<sup>14</sup>.

Avec l'avènement du séquençage à haut débit (next-generation sequencing, NGS), la LAM apparaît comme une maladie complexe, les patients présentant généralement plusieurs mutations dites « conductrices » (drivers) définies comme des mutations qui contribuent fonctionnellement au développement de la leucémie (telles que les mutations *FLT3*, *DNMT3A*, *NPM1*, *CEBPA*, *RUNX1*...), ces mutations coexistent avec des mutations dites « passagères »<sup>15</sup> (passengers). La LAM présente aussi un caractère dynamique, avec

l'évolution linéaire et/ou branchée de clones et sous-clones, se modifiant au cours du temps et au fur et à mesure des traitements.

Une vaste étude du consortium TCGA (The Cancer Genome Atlas) basée sur l'analyse de 200 échantillons de patients atteints de LAM *de novo* a identifié des mutations dans plus de 230 gènes (mutés à une fréquence >10 %) et regroupées en neuf catégories suivant le type d'anomalie et la fonction biologique<sup>16</sup> (**Figure 2**). Presque tous les patients présentaient au moins une mutation dans l'une de ces 9 catégories, avec en moyenne 13 mutations par génome dont 5 affectant des gènes mutés de façon récurrente dans la LAM.



**Figure 2** : Paysage mutationnel des LAM *de novo*

Les anomalies somatiques caractérisant les LAM peuvent être groupées en 9 catégories ; certaines mutations sont associées entre elles de façon préférentielle. Issue de Chen *et al.*, Nature Genetics, 2013.

Plus récemment, l'étude de E. Papaemmanuil *et al.* a intégré les données cliniques, cytogénétiques et génétiques, incluant le statut de méthylation, de 1540 échantillons de patients atteints de LAM. De par le nombre important d'échantillons analysés, cette étude

a identifié 11 classes moléculaires et a permis d'isoler des sous-groupes jusqu'alors non individualisés<sup>17</sup>. En particulier, les LAM porteuses d'une anomalie *isocitrate déshydrogénase 2 (IDH2)<sup>R172</sup>*, bien que ne représentant que 1% de la cohorte, constituent une catégorie unique car cette mutation a une signification pronostique et des mutations associées différentes<sup>17</sup> ; certaines associations défavorables ont été identifiées (*FLT3<sup>TD</sup>/DNMT3A/NPM1*). L'identité moléculaire des sous-types de LAM ainsi définis a également montré que les mutations dans des gènes codant pour des modificateurs chromatinien ou les mutations affectant des gènes impliqués dans l'activité d'épissage se retrouvaient préférentiellement dans les LAM développées par des patients ayant été affectés précédemment par un syndrome myélodysplasique (MDS).

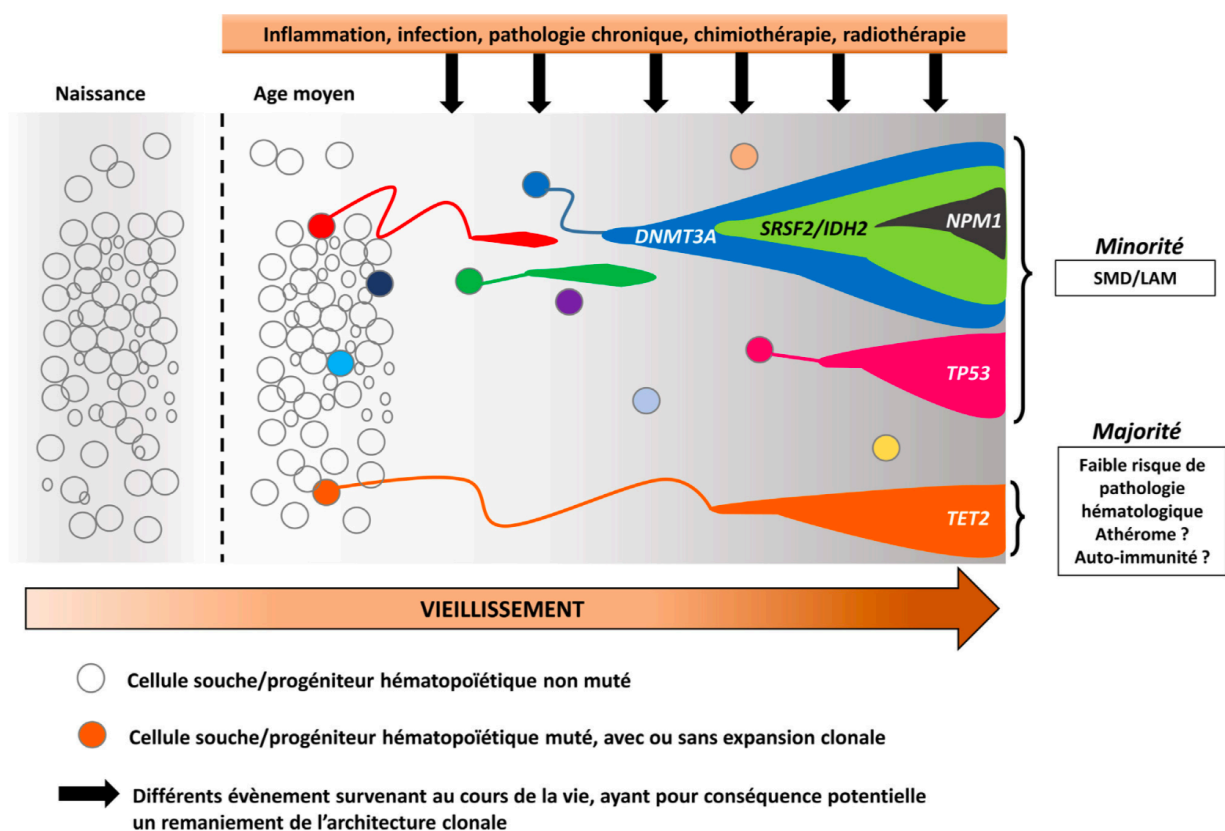
### 1.1.2.3. Hématopoïèse clonale et étape pré-leucémique

Le terme d'« hématopoïèse clonale de signification indéterminée » (ou clonal hematopoiesis of undetermined prognosis, CHIP) décrit l'identification chez des individus sans maladie hématologique, d'une ou plusieurs mutations somatiques dans les cellules hématopoïétiques<sup>18,19</sup>. Les mutations associées à la CHIP et détectées grâce aux techniques de NGS affectent des gènes qui ont été identifiés dans des hémopathies malignes (LAM et SMD). Le gène *DNA méthyltransférase 3 alpha (DNMT3A)*, qui code une ADN méthyltransférase qui catalyse la méthylation *de novo* des bases cytosines dans les dinucléotides CpG, est un des gènes les plus fréquemment mutés dans la CHIP. Le gène *ten-eleven translocation 2 (TET2)*, fait également partie des lésions précoces les plus couramment identifiées dans les CHIP. Ces mutations acquises sont détectées dans les CSH capables de se différencier en cellules myéloïdes et lymphoïdes ; ces CSH mutées reconstituent une hiérarchie hématopoïétique normale, sans changement apparent dans la production de lignées du système hématopoïétique, mais en ayant un avantage compétitif de croissance et de prolifération par rapport aux CSH normales. La notion de seuil de détection de ces mutations, appelé fréquence allélique (ou variant allele frequency, VAF) est essentielle. Pour définir la CHIP, ce seuil a été fixé arbitrairement à 2 % des cellules hématopoïétiques.

Les personnes porteuses d'une CHIP ont un risque plus élevé que la population générale de développer une hémopathie maligne (risque d'évolution vers une hémopathie myéloïde, LAM ou SMD, de 0,5 à 1%)<sup>20</sup>, la maladie qui se développe étant la conséquence de l'expansion du clone mutant préexistant. Plus la VAF est élevée, plus le risque d'évoluer

vers une hémopathie maligne est important<sup>20</sup>. Les CHIP associées à des altérations chromosomiques sont aussi associées au développement de maladies hématologiques, avec des catégories distinctes d'anomalies génétiques stratifiant le risque de transformation<sup>21,22</sup>. Le risque de développer une LAM chez les patients avec une CHIP est spécifique des mutations, c'est-à-dire qu'il est défini par la nature de la lésion, l'abondance du sous-clone et la VAF<sup>23</sup> (**Figure 3**). Le risque d'évoluer vers une LAM est plus faible en présence d'une mutation affectant les gènes *DNMT3A*, *ASXL1* ou *TET2* alors que les mutations affectant les gènes *TP53*, *IDH1* ou *IDH2* génèrent un clone beaucoup plus compétitif et augmente considérablement le risque de transformation<sup>24</sup>. Les CHIP avec anomalie *TET2* sont aussi associées à un risque de pathologies cardio-vasculaires, lié au profil inflammatoire des macrophages eux-mêmes mutés pour *TET2*<sup>25</sup>.

La prévalence des CHIP est influencée par le stress oxydatif, les épisodes inflammatoires et infectieux mais surtout par l'âge (3% des individus avant 50 ans, 10 % des individus âgés de plus de 65 ans, 15% après 70 ans et 20 % à plus de 90 ans). C'est pourquoi la CHIP peut être également référencée comme ARCH (age-related clonal hematopoiesis).



**Figure 3** : Évolution clonale au cours de la LAM

Issue de Danlos *et al*, La revue de médecine interne, 2019.

Il a donc été démontré que la CHIP a aussi été associée à une mortalité accrue en lien avec l'émergence de pathologies non hématologiques. Elle a été modestement associée au diabète de type 2 dans certaines analyses multivariées<sup>26</sup>, mais l'association de risque la plus fréquente est celle qui existe entre CHIP et maladies cardiovasculaires. En effet, les patients avec une CHIP présentent un risque plus élevé de maladie coronarienne et d'accident vasculaire cérébral ischémique<sup>27</sup>.

Les analyses NGS réalisées chez des patients ayant été exposés à des stress génotoxiques, comme la chimiothérapie, le conditionnement préalable à des greffes et les radiations, révèlent l'existence de CHIP post-traitement, souvent liées à des mutations des gènes *TP53* et *Protein Phosphatase Mg<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup>-dependent 1D (PPM1D)*<sup>28,29</sup>. La présence d'une CHIP liée à un traitement préalable est associée à un risque accru de développer des hémopathies malignes secondaires<sup>30,31</sup>. Il est vraisemblable que le mécanisme de sélection des clones associés aux anomalies *TP53* et *PPM1D* soit différent de celui des clones associés aux anomalies *DNMT3A* et *TET2*.

#### 1.1.2.4. Cellules souches leucémiques

La LAM résulte de l'acquisition séquentielle de mutations somatiques dont la plupart se produisent initialement dans le compartiment des CSH<sup>32</sup>. Les échantillons de patients atteints de LAM peuvent présenter une organisation hiérarchique des clones leucémiques avec une fraction de cellules souches leucémiques (CSL) peu abondantes, généralement au sommet de la hiérarchie du clone, qui initie et maintient la maladie. Les CSL présentent généralement un immunophénotype CD34+CD38- partagé par les CSH, associés à des marqueurs qu'elles acquièrent (CD123, CD13) ou qu'elles perdent (CD117) et qui les différencient<sup>33</sup>.

La définition des CSL est avant tout fonctionnelle : ces cellules sont capables d'initier et de maintenir la maladie lorsqu'elles sont transplantées chez des animaux immunodéficients. De manière similaire à la façon dont les CSH génèrent des progéniteurs et des cellules matures, les CSL se différencient pour fournir des cellules progénitrices leucémiques (blastes) et conservent des capacités d'auto-renouvellement et de quiescence à l'origine de leur maintien dans l'environnement médullaire<sup>33</sup>. Les études NGS montrent que les CSL sont majoritairement issues de CSH mutées (pré-leucémiques) ou de leur progénie directe, après acquisition de mutations supplémentaires comme les mutations *NPM1*<sup>34</sup>. Les CSL

peuvent également provenir de progéniteurs plus matures ayant acquis des propriétés de cellules souches comme l'auto-renouvellement comme cela a notamment été montré pour les LAM issues de l'expression de la protéine de fusion mixed lineage leukemia-AF9 (MLL-AF9 ; *MLL* est aujourd'hui nommé *lysine methyltransferase 2A*, *KMT2A*) et issues de progéniteurs GMP<sup>35</sup>.

Les CSL présentent un statut métabolique principalement dépendant de la phosphorylation oxydative mitochondriale (OXPHOS)<sup>36</sup> et des voies d'oxydation des acides gras (aussi appelée  $\beta$ -oxydation). D'autres voies métaboliques sont importantes, comme le catabolisme des acides aminés (notamment cystéine et valine) à travers l'activité de l'enzyme oxydase 2 (NOX2) dépendante du coenzyme nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH)<sup>37</sup>. Les CSL activent aussi la voie AMP-activated Protein Kinase (AMPK)/fission mitochondriale 1 (FIS1) qui inhibe la différenciation et favorise l'auto-renouvellement<sup>38</sup>. Cet axe contrôle un processus de mitophagie permettant de dégrader les mitochondries stressées (présence de ROS) générées par l'expression des oncogènes et le processus de transformation, alors que dans les CSH normales, cet axe maintient le potentiel d'auto-renouvellement. Les CSL activent également des mécanismes inhibant la mort cellulaire programmée tels que la surexpression de protéines anti-apoptotiques B-cell lymphoma 2 (BCL-2) et/ou myeloid cell leukemia sequence 1 (MCL1) ou encore inhibent de façon fonctionnelle la sérine/thréonine kinase 3 (RIPK3), un régulateur de la nécroptose et inhibiteur de l'inflammasome. La surexpression des membres de la famille BCL-2 dans les CSL représente un facteur important de chimiorésistance<sup>39</sup>. La quiescence des CSL est aussi un facteur de résistance aux chimiothérapies conventionnelles qui ciblent principalement les cellules en division<sup>36,40</sup>.

Les CSL maintiennent conjointement des programmes d'expression génique permettant leur auto-renouvellement et la génération de blastes immatures. De multiples activités génétiques sont modifiées dans les CSL et concourent au maintien de leurs propriétés biologiques, telles que celles liées à l'activité aberrante de facteurs de transcription mutés et/ou sous/sur-exprimés (protéines homeobox A9, (HOXA9)<sup>41</sup>, RUNX1 ou Spi-1 proto-oncogène (PU.1/Spi1) pour exemples) ou l'activité modifiée de facteurs de l'épigénèse (mutations affectant *DNMT3A*, *TET2*, *MLL|KMT2A*<sup>41</sup>, *enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit (EZH2|PRC2)*<sup>42,43,44</sup>, *lysine demethylase 1A (KDM1A)|LSD1*<sup>45</sup> pour exemples). En particulier, les anomalies affectant le statut de méthylation de l'ADN<sup>46,47</sup>, par le biais des anomalies *TET2* ou *DNMT3A*<sup>48</sup>, ou les mutations affectant le statut de méthylation de l'ARN, par le biais des anomalies *alkB homolog 5 RNA demethylase*

(*ALKBH5*) ou *YTH N6-methyladenosine RNA binding protein 2* (*YTHDF2*<sup>49</sup>), ou encore le statut de méthylation des histones (par le biais des anomalies des gènes *KMT2A*, *ASXL1* ou *EZH2*<sup>44</sup>) ainsi que les anomalies d'épissage de l'ARN (anomalies des gènes *serine and arginine rich splicing factor 2* (*SRF2*) ou *splicing factor 3b subunit 1* (*SF3B1*) pour exemples<sup>50</sup>) sont des processus majeurs de la transformation multi-étapes des cellules hématopoïétiques. La transformation complète résulte alors de coopérations oncogéniques avec d'autres mutations qui vont dicter le phénotype de l'hémopathie selon leur activité ou la cellule où elles surviennent.

On peut noter que dans la LAM, la persistance de CSL qui possèdent des caractéristiques de cellules souches, notamment la quiescence, est associée à une réponse plus faible au traitement conventionnel, à un risque plus élevé de rechute et à une moins bonne survie<sup>51,52</sup>.

#### 1.1.2.5. *Dérégulation des mécanismes de contrôle de la méthylation/déméthylation des cytosines*

Les dinucléotides CpG représentent 1 à 4 % de l'ADN génomique de mammifère et environ 75 % d'entre eux sont méthylés. La plupart sont situés dans les séquences répétées. Ils sont aussi concentrés dans les îlots CpG, souvent dans les régions promotrices, en général non méthylées et associées à une transcription active. Les analyses fonctionnelles des mutations *TET2*, *DNMT3A* et *IDH* montrent qu'elles altèrent la régulation transcriptionnelle de régions génomiques en modifiant leur niveau de méthylation de l'ADN, et aussi celui d'autres marques épigénétiques pour *IDH* (cf. *infra*). Seules, ces anomalies ne provoquent pas la transformation, mais affectent la différenciation et confèrent aux cellules mutées un avantage de croissance. Les anomalies *TET2* sont principalement des pertes de fonction et leur conséquence fonctionnelle est une hyper-méthylation de l'ADN (cf. *infra*). Dans les hémopathies malignes sans anomalie *TET2*, la fonction des protéines *TET2* peut aussi être affectée de façon indirecte. En effet, les mutations du gène *Wilms' Tumor 1* (*WT1*) empêchent son interaction avec *TET2*, et il en résulte une perte d'activité de *TET2*<sup>53,54</sup>. Les mutations de *DNMT3A* conduisent elles à un décalage de la phase ouverte de lecture et à des mutations non-sens et faux-sens ; l'exemple le mieux connu est celui de la mutation faux-sens *DNMT3A*<sup>R882</sup> (40-60% des anomalies *DNMT3A*) qui induit une activité catalytique diminuée et un effet dominant négatif de la forme *DNMT3A* mutée<sup>55</sup>.

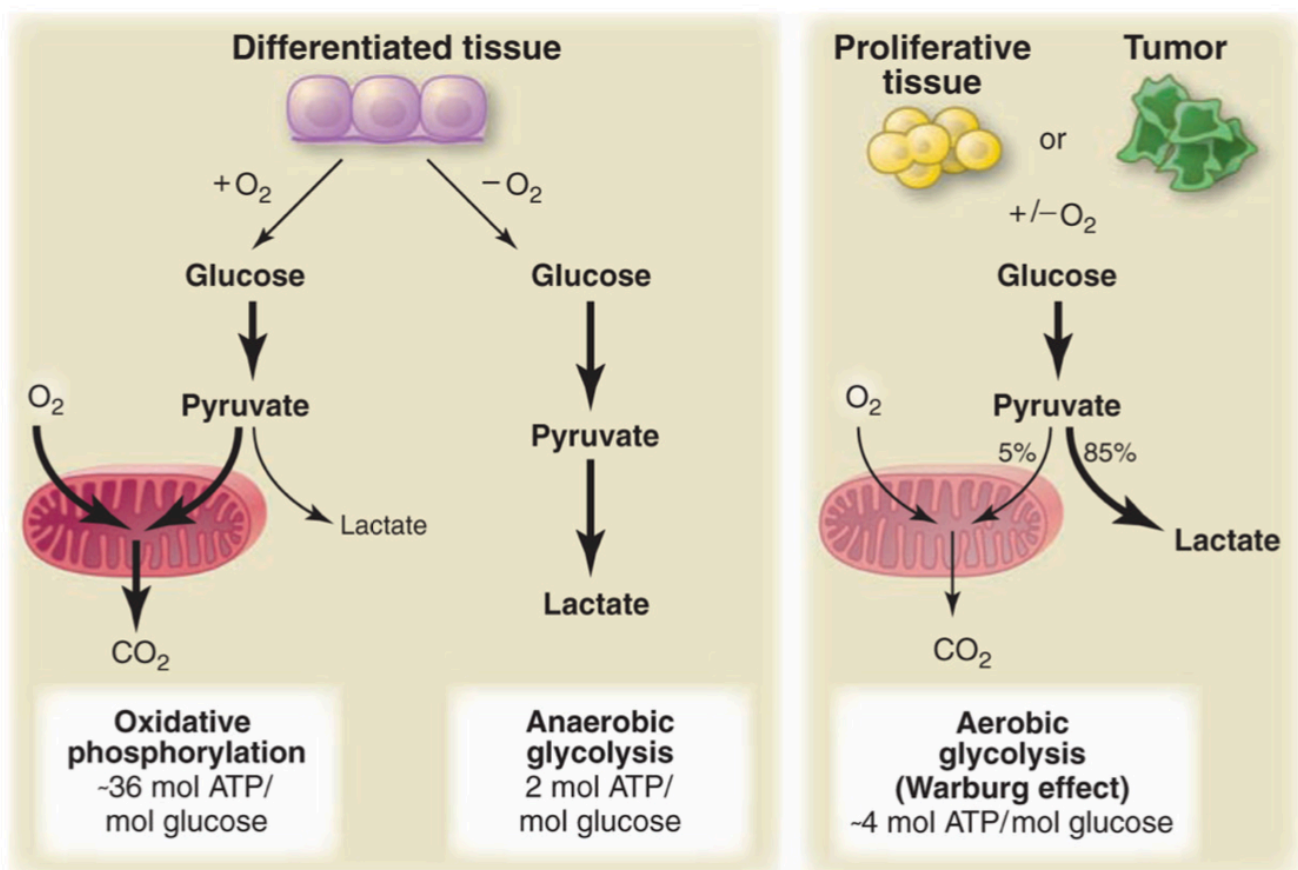


## 1.2. ALTÉRATIONS DU MÉTABOLISME DANS LES LAM

### 1.2.1. Métabolisme : généralités

Les cellules cancéreuses peuvent être caractérisées par un ensemble de caractéristiques communes comprenant le maintien de la prolifération cellulaire, une réplication infinie, l'échappement au système immunitaire, une capacité métastatique ou encore la résistance à la mort, décrites de façon détaillée par les Drs Hanahan et Weinberg<sup>56</sup>. Les cellules cancéreuses se caractérisent par une prolifération dont le maintien dans le temps ne peut être supporté que par l'apport continu d'énergie. Pour cela, ces cellules s'appuient sur une autre de leurs caractéristiques qui est la reprogrammation métabolique<sup>57</sup>. L'effet Warburg, décrit dans les années 1920 par le Dr. Otto Heinrich Warburg, est sans doute la reprogrammation la plus connue et la plus étudiée (**Figure 4**).

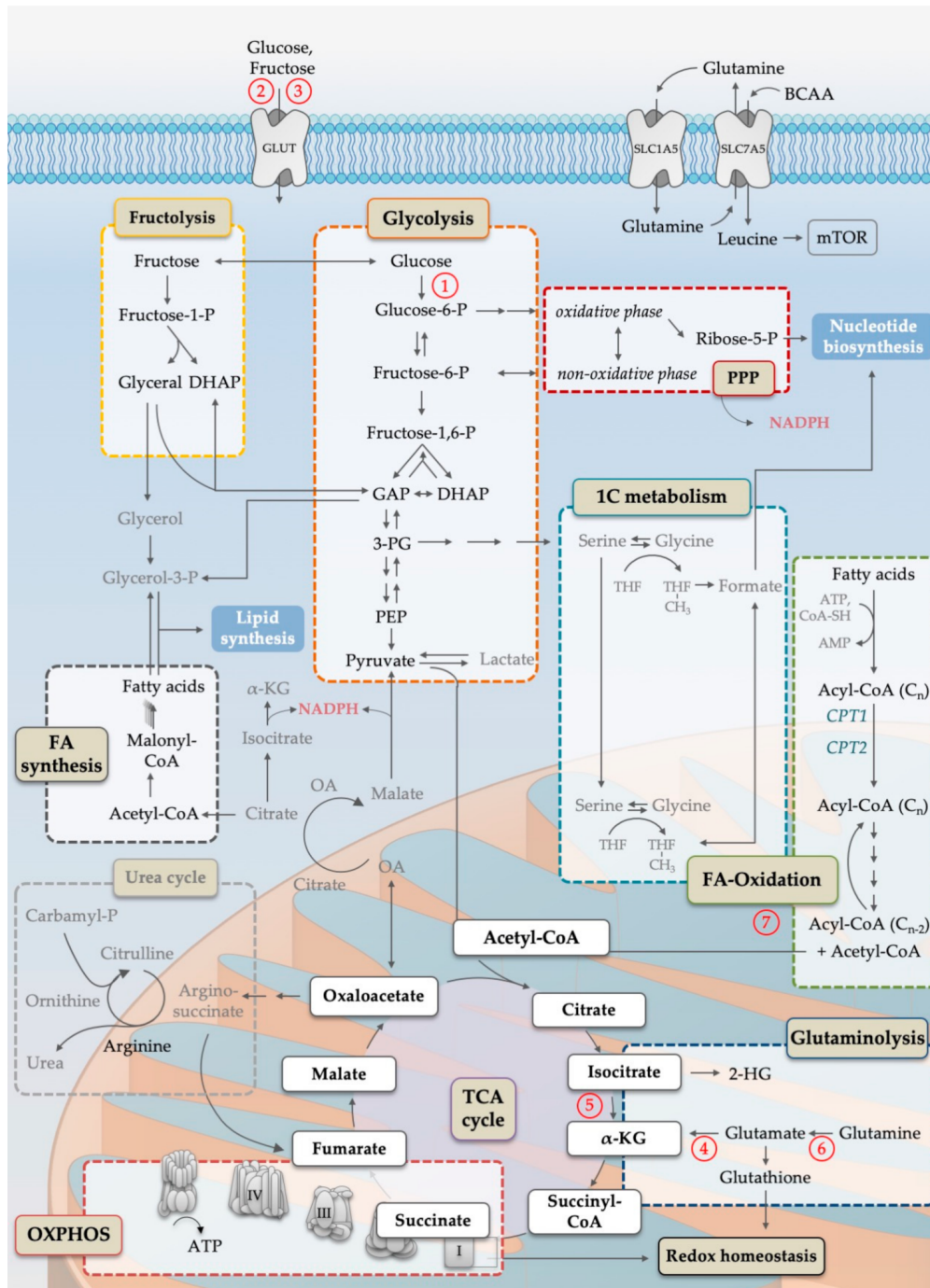
En condition normoxique, les cellules non tumorales utilisent la phosphorylation oxydative mitochondriale comme source d'énergie. Dans un environnement hypoxique, une glycolyse anaérobie soutient la croissance et la prolifération cellulaire. L'effet Warburg postule que pour les cellules cancéreuses, quelles que soient les conditions d'oxygénation, les cellules augmentent leur absorption du glucose et dépendent de la glycolyse anaérobie ; cette adaptation métabolique serait irréversible.



#### **Figure 4** : Représentation schématique de l'effet Warburg

Dans cette réaction, que l'oxygène soit présent ou non, le glucose est converti en lactate par l'enzyme lactate déshydrogénase A (LDHA) ( $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}^+$ ), cette réaction génère 4 molécules d'ATP par molécule de glucose, ce qui donne des rendements en ATP bien inférieurs à ceux de la réaction OXPHOS (36 molécules d'ATP générées). La production de lactate tend à acidifier le microenvironnement, nuisant aux cellules saines et favorisant le maintien des cellules tumorales. Issue de Vander Heiden *et al.*, Science, 2010.

Cette réaction est favorisée par les cellules cancéreuses, non pas pour la production d'énergie (production d'ATP), mais pour la production de molécules qui seront utilisées pour la synthèse de macromolécules (lipides, nucléotides et acides aminés)<sup>58</sup>. En effet, les cellules tumorales ont des besoins métaboliques qui vont au-delà de la production d'ATP et requièrent des carbones anaboliques. Ce choix permet l'apport rapide de biomasse (membrane cellulaire, ribosomes, synthèse d'ADN), nécessaire à la production d'une nouvelle cellule<sup>59</sup>. L'effet Warburg est régulé par des nombres de voies de signalisation, tel que l'axe phosphatidyl-inositol-3 kinase (PI3K)/AKT (aussi appelée protéine kinase B (PKB)/mammalian target of rapamycin (mTOR)), et différents oncogènes et suppresseurs de tumeurs (Myc, RAS, TP53)<sup>60</sup>. L'effet Warburg a aussi été associé récemment à une hyperactivité de l'enzyme LDHA, dont l'activité est normalement contrôlée par le suppresseur de tumeur folliculine (FLNC) inactivé dans les tumeurs<sup>61</sup>. Les cellules tumorales utilisent aussi la voie des pentoses phosphates (PPP), hautement énergétique et qui produit des nucléotides, des acides aminés et des coenzymes NADPH/NADP<sup>+</sup><sup>62</sup>. Plusieurs voies du métabolisme cellulaire sont importantes pour la physiopathologie de la LAM (**Figure 5**).



**Figure 5 :** Schéma simplifié des voies du métabolisme cellulaire importantes pour la physiopathologie de la LAM

L'oxydation du glucose au cours de la glycolyse (encadré orange) génère des intermédiaires carbonés qui peuvent être métabolisés dans la voie du pentose-phosphate (PPP, encadré rouge foncé) et dans le métabolisme à un carbone (1C, encadré bleu), générant tous deux des substrats pour la biosynthèse des nucléotides. La voie des PPP ainsi que les réactions catalysées par les enzymes IDH et l'enzyme malique à NADP (NADP-ME) sont les principaux producteurs de NADPH cytosolique. La dégradation enzymatique du fructose par la fructolyse (encadré jaune) fournit des intermédiaires carbonés pour la voie glycolytique ainsi que des substrats pour la synthèse des lipides. L'acétyl-CoA, généré

par la glycolyse, la fructolyse ou la  $\beta$ -oxydation des acides gras (encadré vert), est le point de départ du cycle de Krebs (TCA, cercle violet), indispensable pour assurer la phosphorylation oxydative (OXPHOS, encadré rouge). L'acétyl-CoA est utilisé pour la réaction de transformation de l'oxaloacétate (OA) en citrate. Le citrate peut ensuite être utilisé pour générer de l'acétyl-CoA cytosolique requis dans la synthèse des acides gras (encadré gris). Les intermédiaires du cycle de Krebs, comme l'OA, sont liés au cycle de l'urée, une source importante d'arginine. En revanche, les réactions anaplérotiques, comme la glutaminolyse (encadré bleu foncé), réapprovisionnent le cycle de Krebs. De plus, la glutaminolyse est importante pour la synthèse du glutathion, un acteur majeur dans le maintien de l'homéostasie redox cellulaire. L'échange de la glutamine contre des acides aminés à chaîne ramifiée (en particulier la leucine) est connu pour activer le complexe mTORC1, reliant directement ces métabolites aux programmes de croissance anabolique liée à la synthèse des nucléotides, des lipides et, en particulier, des protéines. Les flèches simples indiquent la direction préférée des réactions des voies principales, tandis que les flèches multiples indiquent des étapes multiples de réaction. Abréviations : 1C, un carbone ; 2-HG, 2-hydroxyglutarate ; 3-PG, acide 3-phosphoglycérique ;  $\alpha$ -KG, alpha kétoglutarate ; AMP, adénosine monophosphate ; ATP, adénosine triphosphate ; BCAA, acides aminés à chaîne ramifiée ; CoA, coenzyme A ; CPT, carnitine palmitoyl transférase ; DHAP, dihydroxyacétone phosphate ; FA, acide gras ; GAP, glycéraldéhyde-3-phosphate ; GLUT, famille des transporteurs du glucose/fructose ; mTOR, mammalian target of rapamycin ; NADPH, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; OA, oxaloacétate ; OXPHOS, phosphorylation oxydative ; -P, -phosphate ; PEP, phosphoénolpyruvate ; PPP, voie des pentose-phosphate ; SLC, famille des transporteurs de solutés ; TCA, cycle de l'acide tricarboxylique ; THF, tétrahydrofolate. Les chiffres encadrés font référence aux facteurs déterminants de la réponse métabolique dans la LAM. Issue de <sup>63</sup>.

### 1.2.2. Dépendance à la glycolyse des LAM

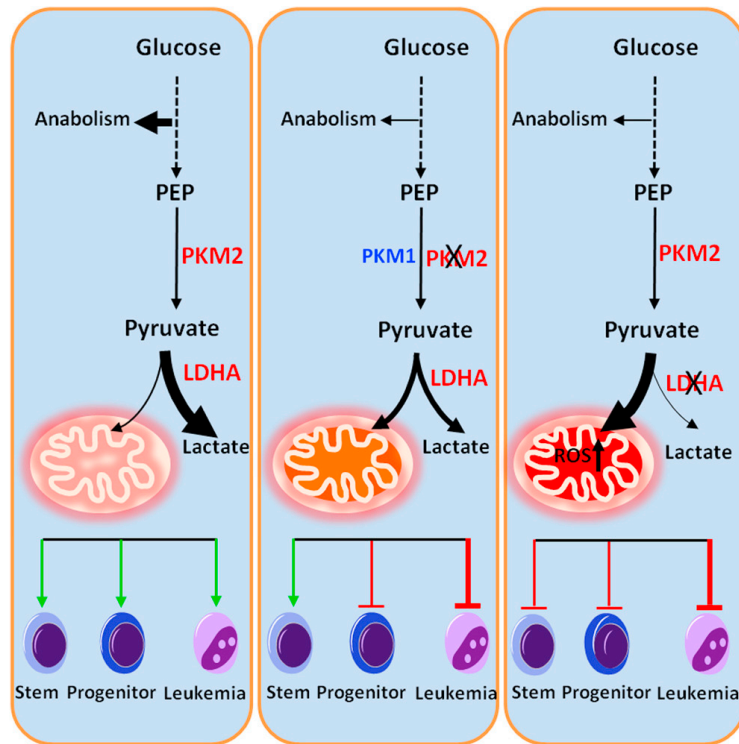
La glycolyse est contrôlée en partie par l'axe PI3K/AKT/mTOR et par l'activité d'enzymes glycolytiques (hexokinase 2, HK1 et hexokinase 2, HK2 pour exemples)<sup>64</sup>, activités qui peuvent être dérégulées dans les LAM<sup>65</sup>. La glycolyse des cellules de LAM dépend notamment de l'activité de mTORC1, un des complexes multi-protéique associant mTOR<sup>66</sup>. L'utilisation d'inhibiteurs de mTOR/mTORC1 tels que la rapamycine ou des inhibiteurs catalytiques s'est avérée décevante en clinique, car il n'y a pas d'addiction oncogénique à mTORC1 dans les LAM. En revanche, l'activation de mTORC1 est une condition nécessaire à l'induction de la mort cellulaire en réponse à l'activation de AMPK, qui contrôle aussi le flux glycolytique par l'activation du transporteur Glut1<sup>67</sup>, ce qui établit une relation de létalité synthétique entre ces deux voies, exploitable d'un point de vue thérapeutique. Les mutations *FLT3<sup>ITD</sup>* en activant HK2 par l'intermédiaire d'AKT, rendent les cellules LAM *FLT3<sup>ITD</sup>* dépendantes à la glycolyse<sup>68</sup>. Lorsque le flux glycolytique est élevé, la leucémie

est plus agressive par la réduction du processus d'autophagie<sup>69</sup>. L'utilisation de BKM120, un inhibiteur de classe I de PI3K, affecte la progression leucémique dans un modèle pré-clinique<sup>70</sup>.

L'absorption du glucose est médiée par les transporteurs GLUT. Les transporteurs GLUT1 sont régulés par des voies de signalisation (PI3K/AKT, voie de réponse à l'hypoxie HIF) et des oncogènes (KRAS, BRAF) dans de nombreux cancers<sup>71,72</sup>. La surexpression du gène *GLUT1/SLC2A1* est corrélée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de LAM (résistance à la chimiothérapie et rechute)<sup>73</sup>. Les cellules leucémiques augmentent aussi la transcription du gène *GLUT5/SLC2A5* qui est un transporteur du fructose ; là encore les LAM qui présentent un niveau élevé de ce transporteur sont associées à un mauvais pronostic. Les cellules leucémiques induisent des variations de l'homéostasie métabolique de l'hôte pour assurer des concentrations élevées de glucose dans la MO, provoquant une augmentation de l'insulino-résistance et une inhibition de sécrétion de l'insuline par les tissus<sup>74</sup>.

Le glucose 6 phosphate (G6P) produit par HK2 peut aussi intégrer la voie PPP car il est dégradé par le glucose 6 phosphate dehydrogenase (G6PDH), première enzyme de la voie PPP. Les gènes de la voie PPP sont aussi surexprimés dans 60% des LAM et l'inhibition de cette voie entraîne une suppression partielle de la croissance des cellules LAM<sup>75</sup>.

D'autres acteurs du métabolisme interviennent dans le contrôle de la glycolyse dans les cellules de LAM, comme la pyruvate kinase M2 (PKM2) qui catalyse la transformation du phosphoénolpyruvate (PEP) en pyruvate, qui favorise la glycolyse aérobie contrairement à la forme PKM1 (Pyruvate Kinase Muscle 1)<sup>76</sup>, et dont l'inhibition affecte la croissance des LAM induites par les oncogènes BCR-ABL et MLL-AF9 dans des modèles murins tout en préservant les fonctions normales des CSH<sup>77</sup>. L'inhibition de l'activité LDHA, en affectant également la glycolyse, réduit la croissance des cellules de LAM dans des modèles murins<sup>77</sup> (**Figure 6**).



**Figure 6** : La suppression d'enzymes contrôlant la glycolyse aérobie module le métabolisme du glucose et affecte spécifiquement les populations cellulaires hématopoïétiques et leucémiques

Abréviations : PEP, phosphoénolpyruvate ; PKM1, pyruvate kinase M1 ; PKM2, pyruvate kinase M2 ; LDHA, lactate déshydrogénase A ; ROS, espèces réactives de l'oxygène. Issue de <sup>77</sup>.

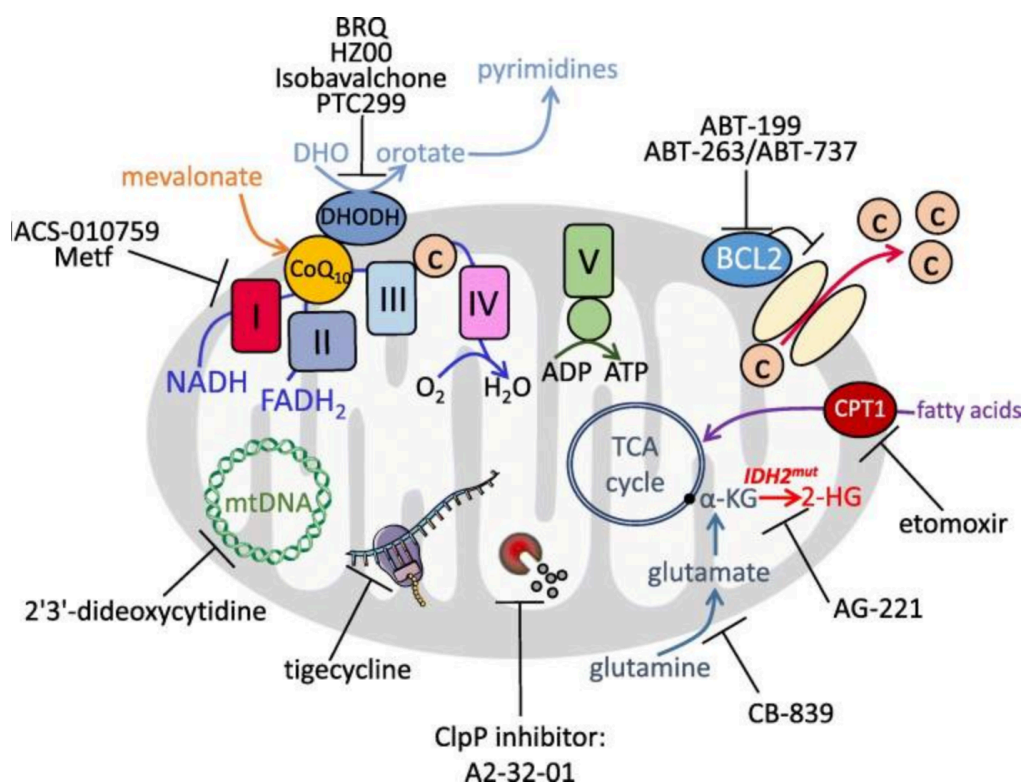
### 1.2.3. Dépendance au métabolisme mitochondrial des LAM

Au carrefour de voies métaboliques, la mitochondrie est impliquée de façon majeure dans le métabolisme des cellules leucémiques.

Des mutations du génome mitochondrial (ADNmt) sont fréquentes chez les patients atteints de LAM<sup>78</sup>, telles que les mutations dans les gènes mitochondriaux codant pour les sous-unités I et II de la cytochrome c oxydase du complexe IV<sup>79</sup>. Des activités mitochondriales exacerbées ont aussi été décrites (activité accrue de l'enzyme cytidine nucléoside kinase qui régule la biogenèse de l'ADNmt)<sup>80</sup>. Les cellules de LAM présentent une biogenèse mitochondriale plus importante et une consommation d'oxygène plus élevée que les progéniteurs myéloïdes normaux<sup>81</sup>. Cette observation peut être exploitée d'un point de vue thérapeutique (inhibition par la tigécycline de la traduction mitochondriale par exemple<sup>81</sup>). Cependant, cette masse mitochondriale plus élevée ne montre pas une activité plus intense des complexes de la chaîne respiratoire et les cellules de LAM restent sensibles au stress oxydatif (d'ailleurs, plus que les cellules hématopoïétiques normales<sup>82</sup>). C'est

pourquoi des stratégies thérapeutiques visant à induire un stress oxydatif, par exemple par le traitement avec l'acide gras palmitate<sup>82</sup>, sont étudiées.

Parce que les cellules de LAM ont un taux accru de métabolisme oxydatif, l'inhibition des processus mitochondriaux (traduction des protéines mitochondriales, réplication de l'ADN mitochondrial ou dégradation des protéines mitochondriales) cible préférentiellement les cellules de LAM et les CSL par rapport aux cellules hématopoïétiques normales. Les drogues s'adressant à ces fonctions mitochondriales ont été testées dans des modèles précliniques. L'IACS-010759, un inhibiteur du complexe I de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, bloque la prolifération, induit l'apoptose et induit également une différenciation myéloïde partielle qui se manifeste par l'expression du marqueur CD14<sup>83</sup>. Cette molécule est actuellement évaluée dans le cadre d'essais cliniques de phase I dans les LAM en rechute ou réfractaires (LAM R/R). L'inhibition de la protéase mitochondriale ClpP (gros complexe de près de 300 kDA induit en réponse au stress cellulaire) avec les molécules A2-32-01258 ou ONC212, réduit la viabilité des cellules leucémiques en induisant l'apoptose<sup>84,85</sup> (**Figure 7**).



**Figure 7** : Le métabolisme mitochondrial peut être ciblé dans les cellules LAM par des inhibiteurs pharmacologiques

Abréviations : c, cytochrome c ; BCL2, B-cell lymphoma 2 ; CPT1, carnitine palmitoyltransferase 1 ;  $\alpha$ -KG, alpha-kétoglutarate ; 2-HG, 2-hydroxyglutarate ; mtDNA, ADN mitochondrial ; DHO, dihydroorotate ; DHODH, dihydroorotate déshydrogénase ; CoQ<sub>10</sub>, coenzyme Q10 ; TCA, cycle de l'acide tricarboxylique. Issue de Stuani et *al.*, BMC Biol, 2019.

La mitochondrie par son activité OXPHOS est la source la plus importante de ROS. La production de ROS est normale pour tous les organismes vivant en aérobie et ne constitue pas, en soi, une situation de stress oxydant. Dans les CSL, le potentiel redox de la mitochondrie contrôle pour partie l'équilibre entre auto-renouvellement et différenciation (via HIF1 $\alpha$  <sup>86,87,88</sup> et l'activité des facteurs de transcription Forkhead O, FoxO<sup>89</sup>).

Les cellules leucémiques qui ont une activité OXPHOS génèrent une réponse anti-oxydante pour se protéger des ROS et adaptent leur métabolisme<sup>90</sup>. Par ailleurs, les ROS participent à la fois à la biologie des CSL (auto-renouvellement) et à la résistance aux drogues (chimiothérapies et rayonnements ionisants) des CSL<sup>91</sup> et des blastes<sup>92</sup>. Une concentration intracellulaire élevée de ROS entraîne une augmentation des cassures double-brin de l'ADN et des erreurs de réparation pouvant favoriser l'évolution tumorale<sup>93</sup>. Une production extracellulaire de ROS est aussi observée chez plus de 60% de patients atteints de LAM attribuable à l'activation constitutive des enzymes NADPH oxydases NOX<sup>94</sup>.

Bien que les CSL soient sensibles aux stratégies qui altèrent leur activité OXPHOS, ces cellules sont souvent considérées comme métaboliquement dormantes par rapport aux cellules de LAM. À l'appui de cette notion, les CSL présentent des niveaux réduits de masse mitochondriale et des niveaux inférieurs de ROS et d'ATP par rapport aux cellules de LAM (bulk leucémique)<sup>36</sup>. De façon intéressante, les CSL à faible taux de ROS (CSL ROS<sup>low</sup>) surexpriment la protéine anti-apoptotique BCL-2<sup>36</sup> ; c'est pourquoi il avait été proposé que le venetoclax (inhibiteur de BCL-2, de la famille des BH3 mimétiques qui déclenchent l'apoptose en perturbant la liaison entre le domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques et la fente hydrophobe des protéines anti-apoptotiques telles que BCL-2) cible particulièrement les CSL ROS<sup>low</sup>, incapables de maintenir une production d'énergie par la glycolyse ou l'oxydation des acides gras<sup>36</sup>. Plus récemment, il a été montré que les CSL présentent des niveaux élevés d'acides aminés par rapport aux cellules de LAM, invalidant l'idée d'un métabolisme dormant<sup>95,96</sup>. La sensibilité accrue des CSL à la privation d'acides aminés met en évidence un état « d'inflexibilité métabolique » et une capacité limitée des CSL à faire face au stress ou à survivre dans des conditions de nutriments limités. Ces



cellules dépendent tout autant du métabolisme des acides gras<sup>97</sup>. Ainsi, les CSL ont des exigences métaboliques uniques qui offrent des opportunités thérapeutiques<sup>95,96,97</sup>.

L'oxydation des acides gras pourrait être impliquée dans la régulation de BCL-2 et dans la formation de pores de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) dépendante des protéines BCL-2 associated X apoptosis regulator (BAX) et BCL2 antagonist/killer 1 (BAK), par le biais d'interactions entre la protéine carnitine transporter 1 (CPT1) (impliquée dans l'oxydation mitochondriale des acides gras à longue chaîne, AGLC) et la protéine pro-apoptotique BH3 interacting domain (BID)<sup>98</sup> ou la protéine BCL-2<sup>99</sup>. Cette observation souligne l'intérêt d'une inhibition de l'oxydation des acides gras associée à l'usage des BH3 mimétiques dans la LAM. De fait, outre la diminution de l'expression de BCL-2, la résistance au venetoclax peut résulter de l'incapacité à engager l'apoptose par la perte de BAX<sup>100</sup>.

Les essais cliniques utilisant le venetoclax en association avec des agents hypométhylants (azacitidine et decitabine) chez des patients atteints de LAM, ont montré une activité anti-leucémique supérieure à celle de ces mêmes agents utilisés en monothérapie<sup>96,101,102</sup>, il est à noter que l'association du venetoclax et de l'azacitidine inhibe l'absorption et le catabolisme des acides aminés<sup>96</sup>.

#### **1.2.4. Dépendance au métabolisme des acides gras**

La  $\beta$ -oxydation s'effectue dans la matrice mitochondriale alors que la synthèse des acides gras est cytosolique<sup>103</sup>. Ces processus catabolique et anabolique sont régulés par la kinase AMPK qui est activée lorsque la production d'ATP intracellulaire diminue et qui inhibe par phosphorylation l'acetyl-CoA carboxylase 1 cytosolique (ACC1) et l'acetyl-CoA carboxylase 2 mitochondriale (ACC2)<sup>104</sup>. Ces deux enzymes catalysent la formation de malonyl-CoA à partir d'acetyl-CoA et régissent l'anabolisme et le catabolisme des acides gras. Le malonyl-CoA généré par l'ACC2 inhibe la carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) et peut ainsi inhiber la  $\beta$ -oxydation, tandis le malonyl-CoA dérivé de l'ACC1 permet la synthèse des acides gras et n'exerce pas d'effet suppresseur sur CPT1<sup>105</sup>.

##### *1.2.4.1. Anabolisme des acides gras*

Ce processus permet d'augmenter la biomasse et de soutenir la prolifération cellulaire en fournissant des molécules de signalisation<sup>106</sup>. L'inhibition d'enzymes comme la fatty acid synthase (FASN)<sup>107</sup> et la stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1)<sup>108</sup>, perturbe la synthèse des

lipides et induit l'apoptose de cellules de LAM. SCD1 peut être inhibée par BaP, une combinaison de bézafibrate régulateur des lipides et d'acétate de médroxyprogestérone, une hormone sexuelle<sup>108</sup>. Ce traitement perturbe le métabolisme intermédiaire et le métabolisme des prostaglandines et entraîne l'arrêt de la croissance et la différenciation de cellules de LAM<sup>109,110</sup>. Un autre exemple est celui de la dépendance des cellules leucémiques, mais pas de leurs homologues myéloïdes normaux, à l'activité de l'enzyme aldehyde dehydrogenase 3 family member A2 (ALDH3A2) qui catalyse la conversion des aldéhydes aliphatiques à longue chaîne en acide gras pour prévenir les dommages oxydatifs cellulaires. Cette dépendance a été observée en modèles murins et sur lignées cellulaires LAM humaines ; l'inhibition de ALDH3A2 est synthétiquement létale avec l'inhibition de l'enzyme glucoperoxydase 4 (GPX4), ce qui permet une approche thérapeutique combinée basée uniquement sur l'état métabolique<sup>111</sup>.

Il est aujourd'hui connu que la séléno-protéine GPX4 est l'enzyme centrale de la détoxification des lipides peroxydés, l'accumulation de ces lipides modifiés est létale pour la cellule (les lipides peroxydés entraînent un mécanisme de mort cellulaire appelé ferroptose<sup>112</sup>). De façon intéressante, la synthèse de GPX4 pourrait dépendre de la disponibilité en nutriments puisque son expression passe par l'axe de signalisation mTORC1/4EBP et est induite par l'absorption de cyst(é)ine<sup>113</sup>.

#### *1.2.4.2. Catabolisme des acides gras*

La plupart des cellules tumorales réduisent la proportion de glucose converti en acétyl-CoA (oxydé dans le cycle de Krebs) ; ces cellules deviennent donc plus dépendantes de l'oxydation des acides gras pour leurs besoins énergétiques<sup>114,115</sup>. Ce sont les triglycérides du microenvironnement médullaire qui fournissent par lipolyse des acides gras<sup>116</sup>, cette cascade fait intervenir le récepteur  $\beta$ -adrénergique<sup>117</sup>, des protéines G et des enzymes lipolytiques comme la lipase hormonosensible (LHS, ou hormone-sensitive lipase, HSL)<sup>118</sup> et la périlipine A<sup>119</sup>. Les blastes activent la lipolyse des adipocytes de la MO<sup>120</sup>. Les acides gras sont internalisés via le récepteur scavenger CD36 et transférés vers le noyau par la protéine chaperonne fatty acid-binding Protein 4 (FABP4) et peuvent agir comme ligands du récepteur peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ )<sup>121</sup>. L'activation du récepteur PPAR $\gamma$  est associée à de multiples autres activités telles que la régulation du métabolisme du glucose, l'inhibition de l'inflammation, l'induction de la différenciation cellulaire, la suppression de la prolifération cellulaire ou encore la régulation de l'apoptose<sup>122</sup>.

L'oxydation des acides gras est associée à la quiescence et à la résistance aux drogues des CSL, ce qui en fait une voie métabolique d'intérêt en thérapeutique<sup>123</sup>. Par exemple, CPT1 qui conjugue les acides gras avec la carnitine est associé à la signalisation mTOR et l'inhibition de son activité par l'étomoxir sensibilise les cellules leucémiques à la cytarabine<sup>124</sup>. Le ST1326, autre inhibiteur de CPT1A, induit un arrêt de la croissance cellulaire, des dommages mitochondriaux et l'apoptose de cellules de LAM<sup>125</sup>. L'avocatine B provoque également une inhibition de croissance et l'apoptose de cellules de LAM et sa combinaison avec la cytarabine montre un effet synergique<sup>126</sup>. L'inhibition du transporteur de carnitine CT2 réduit la croissance et la viabilité des cellules de LAM<sup>127</sup>. Le déficit en acyl-coenzyme A déshydrogénase des acides gras à chaîne très longue (ou very long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase, VLCAD) entraîne une diminution de la viabilité, de la prolifération, de la clonogénicité et de la prise de greffe des progéniteurs LAM<sup>128</sup>.

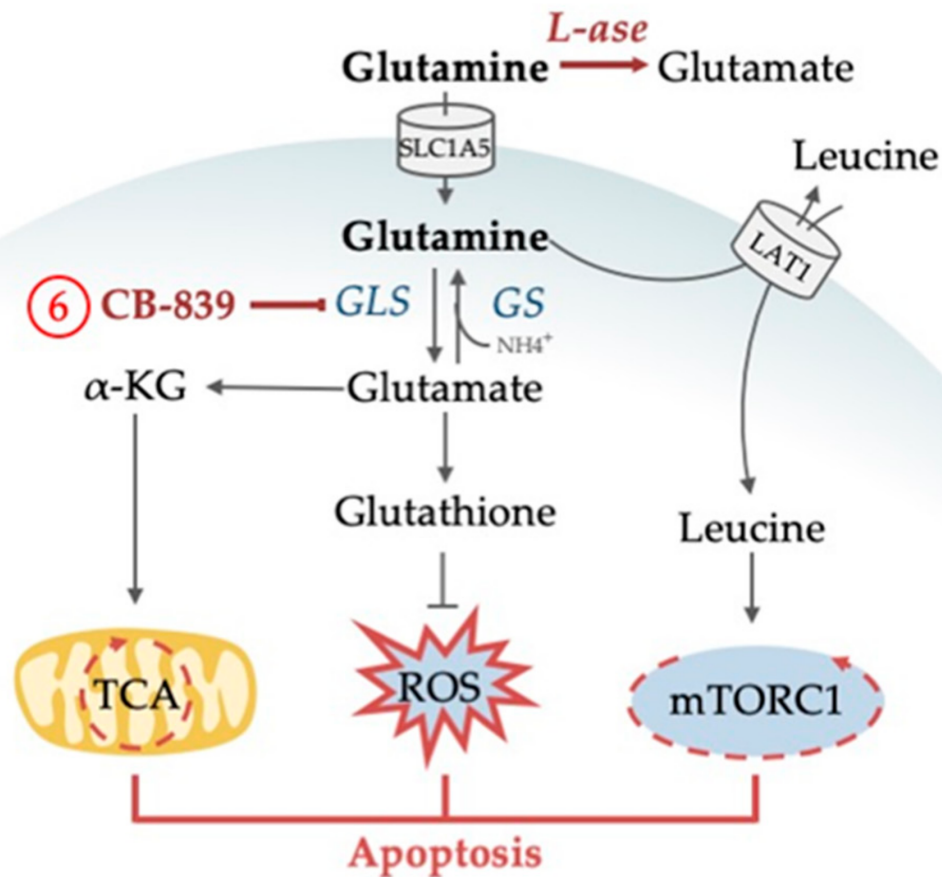
### **1.2.5. Dépendance au métabolisme des acides aminés des LAM**

Plusieurs acides aminés (AA) ont montré une importance singulière dans la croissance et la survie des cellules de LAM<sup>63,106,129</sup>. L'Arginine (Arg), AA semi-essentiel abondant dans l'alimentation, sert d'intermédiaire ou de substrat à de nombreuses voies biologiques, telles que le cycle de l'urée ou le cycle de Krebs (par l'intermédiaire du glutamate)<sup>130</sup>. C'est le principal précurseur de la synthèse de polyamines et de monoxyde d'azote (NO) dont la concentration affecte la croissance tumorale et l'angiogénèse<sup>131</sup>. Les blastes expriment les transporteurs d'arginine cationiques CAT-1 et CAT-2B de façon constitutive. La plupart des cellules de LAM sont déficientes en arginosuccinate synthétase-1 (ASS1), une enzyme qui permet la conversion de la citrulline et de l'aspartate en arginosuccinate, précurseur de l'arginine ce qui rend les cellules de LAM auxotrophes pour l'Arg<sup>106,132</sup>. La faible concentration plasmatique en Arg des patients atteints de LAM<sup>133</sup> s'explique par l'importation d'Arg extracellulaire, ce qui peut être exploité thérapeutiquement. En effet, les activités de l'Arg deiminase (ADI), qui dégrade l'Arg en citrulline, et l'argininase qui dégrade l'Arg en ornithine ont démontré des effets anti-leucémiques *in vitro* et *in vivo* en combinaison avec la cytarabine<sup>134,135</sup>.

La cystéine (Cys) est principalement métabolisée pour produire du glutathion réduit (GSH) nécessaire au maintien du potentiel redox intracellulaire et est requise pour la viabilité des CSL<sup>136</sup>.

La glutamine (Gln) , AA le plus abondant, est un substrat majeur pour les intermédiaires du cycle de Krebs et pour le glutamate et l'aspartate ; il est également requis pour la survie et la prolifération des CSL<sup>95,133</sup>. Une concentration plasmatique faible en Gln chez les patients atteints de LAM est observée. La Gln est hydrolysée en glutamate par la glutaminase (GLS), enzyme souvent surexprimée dans les cellules LAM<sup>137</sup>. Cette réaction de glutaminolyse alimente un certain nombre de voies métaboliques<sup>115,138</sup>. Par exemple, le glutamate peut être soit déshydrogéné par la glutamate déshydrogénase (GDH) pour former de l'alpha-kétoglutarate ( $\alpha$ KG) et incorporer le cycle de Krebs, soit fonctionner comme co-substrat pour les transaminases<sup>139</sup> (cf. *infra*). L'activité GLS peut être inhibée par le CB-839, qui en inhibant la production de glutathion, provoque l'accumulation de ROS mitochondriaux et la mort cellulaire par apoptose (**Figure 8**). Dans la LAM, l'inhibition de l'activité GLS par le CB-839 réduit la phosphorylation oxydative, arrête la prolifération et induit l'apoptose, sans affecter les CSH CD34+. Des observations identiques sont faites en cas d'inhibition de l'expression du transporteur de la Gln SLC1A5 chez la souris<sup>140</sup>. De manière intéressante, l'utilisation du CB-839 démontre une synergie avec le venetoclax<sup>141</sup>. L'association du CB-839 avec des médicaments qui induisent davantage la production de ROS et majorent l'apoptose mitochondriale, tels que le trioxyde d'arsenic et l'homoharringtonine, renforce la mort cellulaire dans les lignées de LAM, les cellules primaires et dans des modèles de transplantation (ou patient-derived-xenograft, PDX)<sup>142</sup>. L'effet antitumoral de la L-asparaginase est principalement liée à son activité glutaminase dans la LAM<sup>140</sup>.

De façon intéressante, le composé CB-839 induit un processus de différenciation partiel de lignées cellulaires de LAM et échantillons de patients avec mutation *IDH*, par inhibition de la production d'oncométabolite D-2HG<sup>137</sup> (cf. *infra*). Le BPTES, un autre inhibiteur de l'activité GLS, inhibe spécifiquement la croissance cellulaire des LAM primaires avec mutations *IDH*, mais pas celle des cellules n'exprimant pas ces mutations<sup>143</sup>. Les bases moléculaires de cet effet ne sont pas connues, mais ces observations suggèrent que l'inhibition de la glutaminolyse et/ou de l'import/export de leucine est un moyen d'induire un effet différenciant partiel.



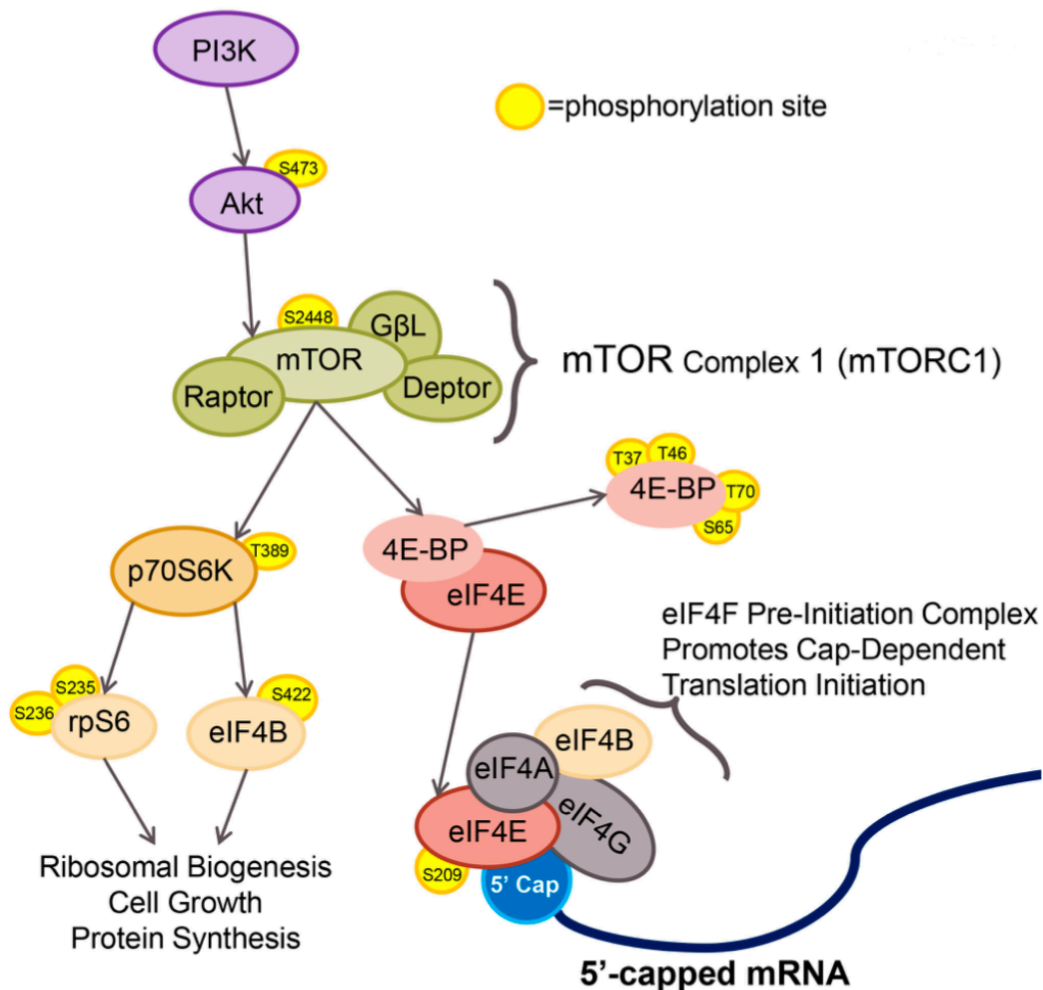
**Figure 8 :** Les cibles médicamenteuses du métabolisme de la Gln dans les LAM

Le composé CB-839 inhibe la glutaminase, empêchant l'utilisation de la Gln dans le cycle de Krebs et la production de glutathion protégeant contre les ROS. La L-asparaginase a une activité glutaminase et dégrade la Gln extracellulaire. Les niveaux de Gln intracellulaire conditionnent l'import de leucine et l'activation de mTORC1. Abréviations : GLS, glutaminase ; GS, glutamine synthétase ;  $\alpha$ -KG, alpha-kétoglutarate ; L-ase, L-asparaginase ; LAT1, large neutral amino acid transporter 1 ; mTORC1, mammalian target of rapamycin complex 1 ;  $\text{NH}_4$ , ammoniac ; ROS, espèces réactives de l'oxygène ; TCA, cycle de l'acide tricarboxylique. Issue de Kreitz *et al.*, Cells, 2019.

La disponibilité en Gln est un des facteurs limitant pour l'activation de la voie anabolique mTORC1. En effet, la concentration intracellulaire en Gln contrôle l'import de leucine, la leucine étant importée dans la cellule en échange de Gln par le transporteur SLC7A5/3A2 ; la leucine est nécessaire à l'activation de mTORC1<sup>144</sup>. La privation en Gln a peu d'effet sur l'activité de mTORC1 dans les CSH CD34+ alors qu'elle affecte la croissance des progéniteurs LAM<sup>140</sup>.

### 1.2.6. Dépendance à la voie mTORC1 des LAM

L'activité mTOR est contrôlée par de nombreux effecteurs dont la kinase Liver kinase B1 (LKB1 ou kinase hépatique B1) qui est une serine/thréonine kinase qui phosphoryle et active AMPK<sup>145</sup>. Ce dernier agit comme un régulateur négatif de voies métaboliques, telles que l'oxydation des acides gras et la glycolyse<sup>146</sup>. Le complexe mTOR contrôle la croissance cellulaire en réponse aux changements environnementaux en nutriments. LKB1 maintient l'auto-renouvellement des CSH<sup>147</sup> et est surexprimé dans les CSL (CD34+CD38-). L'inhibition de LKB1 sensibilise les cellules de la LAM à la chimiothérapie<sup>148</sup>. L'activité mTOR contrôle également le taux de synthèse protéique, processus qui est constamment dérégulé dans les cellules de LAM<sup>268</sup>. mTORC1 contrôle la synthèse protéique par le biais du répresseur de traduction 4E-BP1 qui, sous sa forme hypo-phosphorylée, interagit fortement avec les facteurs d'initiation de la traduction eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E). Cette interaction empêche la liaison de eIF4E avec la protéine d'échafaudage eIF4G<sup>149</sup>. Lorsque la protéine 4E-BP1 est phosphorylée, son interaction avec eIF4E n'est plus possible et la traduction est initiée (**Figure 9**). mTORC1 phosphoryle aussi la kinase p70 S6 (p70<sup>S6K</sup>) sur son résidu Thr389, permettant son activation par l'enzyme 3-phosphoinositide dependent protein kinase-1 (PDK1, aussi nommée PDPK1)<sup>150</sup>. La kinase p70<sup>S6K</sup> phosphoryle et active plusieurs substrats associés à l'initiation de la traduction, notamment les facteurs eIF4B, régulateurs positifs du complexe protéique de liaison à la coiffe 5' des ARNm, eIF4F. Le complexe eIF4F joue un rôle essentiel dans la biologie du cancer, en régulant une traduction de l'ARNm cap-dépendant et en contrôlant sélectivement la synthèse des protéines impliquées dans la croissance des tumeurs et la résistance aux traitements. Par ailleurs, la dérégulation de l'activité mTORC1 dans les cellules cancéreuses augmente la synthèse d'oncogènes (contrôlée au niveau de l'initiation de la traduction)<sup>151</sup>.



**Figure 9** : Contrôle de la traduction par mTORC1

La protéine eIF4E est associée de manière constitutive à la structure de la coiffe à l'extrémité 5' des molécules d'ARNm et s'associe à la protéine d'échafaudage eIF4G pour initier la formation des complexes d'initiation de la traduction (eIF4F). Ce processus est contrôlé par le répresseur de traduction 4E-BP1, qui inhibe la formation de eIF4F lorsqu'il est hypo-phosphorylé en inhibant de manière compétitive le recrutement de eIF4G à eIF4E et en séquestrant eIF4E dans un complexe inactif<sup>152</sup>. La phosphorylation de 4E-BP1, d'abord sur les résidus Thréonine 37 (T37) et Thréonine 46 (T46), puis sur le résidu Sérine 65 (S65), diminue son affinité pour eIF4E et facilite l'assemblage de complexes actifs eIF4E/eIF4G qui stimulent la traduction de l'ARNm<sup>153</sup>. Abréviations : PI3K, phosphatidylinositol 3 kinase ; mTOR, mammalian target of rapamycin ; GβL, sous-unité β du complexe protéine G ; p70S6K, protéine ribosomale S6 kinase ; rpS6, protéine ribosomale S6 ; 4E-BP, eukaryotic initiation factor 4E binding factor protein ; eIF4, eukaryotic initiation factor 4 ; S473, sérine 473 ; S2448, sérine 2448 ; T389, thréonine 389 ; S422, sérine 422 ; S235, sérine 235 ; S236, sérine 236 ; S209, sérine 209 ; T70, thréonine 70. Issue de Shives et *al.*, *Viruses*, 2016.

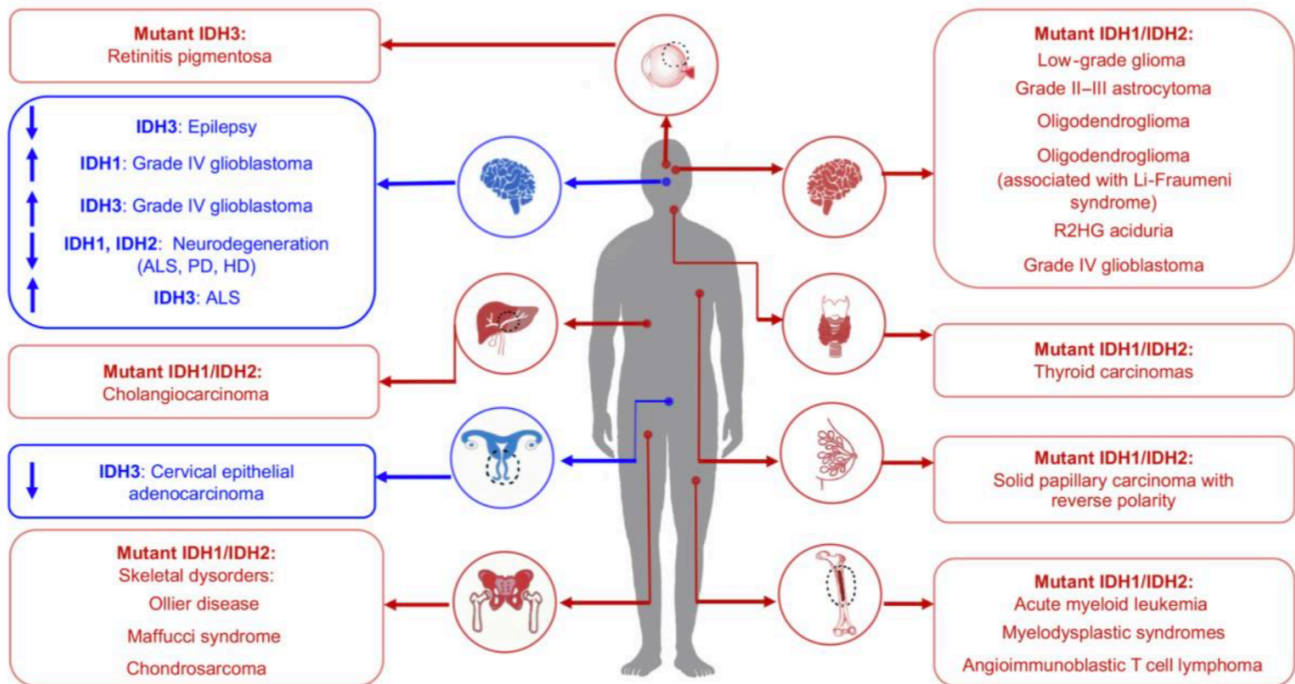
### 1.3. Les leucémies aiguës myéloïdes avec mutation *IDH*

Les mutations des gènes *IDH* sont présentes dans divers types de tumeurs, principalement les gliomes de grade II et III (>70%), les glioblastomes secondaires (55%-88%), les tumeurs du cartilage et osseuses (20%-80%) et les cholangiocarcinomes intrahépatiques (6%-30%). Elles sont présentes dans les hémopathies malignes, LAM (15%-20%), syndromes myélodysplasiques (SMD) et myéloprolifératifs (SMP) et les lymphomes angio-immunoblastiques (AITL)<sup>154</sup> (**Figure 10**). Les mutations *IDH* (*IDHm*) sont considérées comme des événements précoces de la leucémogénèse<sup>155</sup>. Leur valeur pronostic dépend de la nature de l'anomalie et de leur association avec d'autres mutations (*FLT3-ITD* ou *NPM1*)<sup>156</sup>.

Les mutations *IDH* sont présentes dans les CHIP, leurs fréquences par rapport aux anomalies *DNMT3A*, *TET2* ou *ASXL1* et l'incidence des LAM développées ultérieurement pouvant être variables suivant les cohortes étudiées<sup>24,157</sup>.

Les anomalies *IDH* sont fréquentes dans les LAM dites à « caryotype simple » (moins de 3 anomalies). Les anomalies *IDH* sont préférentiellement associées aux mutations *SRSF2*, codant pour un facteur d'épissage, ce qui entraîne dans les cellules LAM doublement mutées des anomalies de maturation des transcrits ayant des conséquences fonctionnelles majeures<sup>158</sup>. La co-occurrence des anomalies *IDH* et *DNMT3A* présente une valeur pronostique<sup>17</sup>; dans un modèle murin, cette co-expression modifie profondément les profils épigénétiques des cellules hématopoïétiques les plus immatures, conduisant notamment à la surproduction de prostaglandine E2 qui active de nombreuses signalisations<sup>159</sup>. Les anomalies *IDH2<sup>R140</sup>* sont fréquemment associées aux mutations *NPM1*, contrairement aux mutations *IDH2<sup>R172</sup>*, qui sont généralement plus isolées. Pour des raisons fonctionnelles, les mutations *IDH* sont rarement associées aux anomalies *TET2* ou *WT1*; ces 3 anomalies, qui conduisent à une hyper-méthylation de l'ADN, sont considérées comme mutuellement exclusives<sup>14,160</sup>.





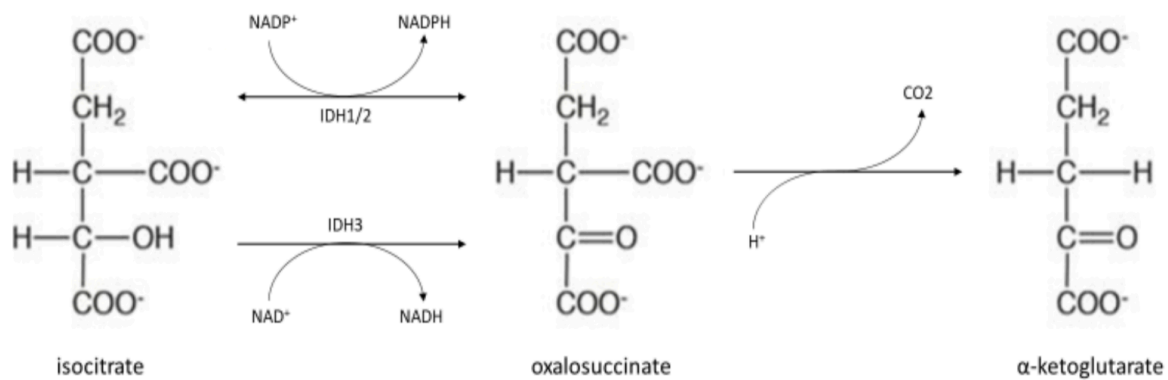
**Figure 10** : Anomalies *IDH* et pathologies humaines

Les surexpressions (en rouge) ou les sous-expressions (en bleu) des enzymes *IDH* ont été observées dans plus d'une vingtaine de néoplasmes. Issue de Tommasini-Ghelfi *et al*, *Sciences Advances*, 2019.

### 1.3.1. Enzymes isocitrate déshydrogénase

#### 1.3.1.1. Propriétés enzymatiques

Il existe trois isoformes d'*IDH*<sup>161</sup>. Dans le cytosol et les peroxysomes, *IDH1* catalyse la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en  $\alpha$ KG (aussi connu sous le nom de 2-oxoglutarate) en passant par un état intermédiaire instable (oxalosuccinate), avec production de  $\text{CO}_2$  et réduction du coenzyme nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ( $\text{NADP}^+$ ) oxydé en NADPH (forme réduite). Cette réaction est bidirectionnelle ; la carboxylation réductrice de l' $\alpha$ KG en isocitrate oxyde le NADPH en  $\text{NADP}^+$  (**Figure 11**). Cette réaction nécessite la liaison d'un ion métallique divalent, généralement  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  ou  $\text{Cd}^{2+}$ . *IDH2* catalyse la même réaction au sein de la mitochondrie. *IDH3* qui est présent également dans la mitochondrie, catalyse la conversion irréversible de l'isocitrate en  $\alpha$ KG, en réduisant le  $\text{NAD}^+$  en NADH. L' $\alpha$ KG est ensuite métabolisé en succinate, tandis que le NADH est utilisé dans la mitochondrie par la chaîne de transport d'électrons pour générer de l'ATP<sup>162</sup>.



**Figure 11** : Réactions catalysées par les enzymes IDH

L'oxalosuccinate est un intermédiaire instable qui perd un groupe bêta-carbonyle libéré sous forme de  $\text{CO}_2$  et qui permet la formation d' $\alpha$ KG. Les réactions médiées par IDH1 et IDH2 sont réversibles tandis que la réaction médiée par IDH3 est irréversible.

Les enzymes IDH1 et IDH2 forment des homo-dimères<sup>161</sup> tandis que l'enzyme IDH3 forme des hétéro-tétramères : les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  forment un hétérodimère ( $\alpha\beta$ ) et les sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$  forment un hétérodimère ( $\alpha\gamma$ ) qui sont assemblés en hétéro-tétramère ( $2\alpha:1\beta:1\gamma$ ). Ces structures peuvent être dimérisées en un hétéro-octamère (hétéro-tétramère et hétéro-octamère sont appelés holoenzyme). La sous-unité  $\alpha$  porte l'activité catalytique, la sous-unité  $\beta$  structure l'assemblage de l'holoenzyme et la sous-unité  $\gamma$  joue un rôle régulateur dans l'holoenzyme.

Ces enzymes possèdent deux sites de liaison par ligand (isocitrate,  $\text{Mn}^{2+}$ , NAD et ADP) et par hétéro-tétramère. Ce sont des enzymes allostériques soumises à régulation par l'ADP et le citrate et inhibées par l'ATP et le NADH. Ainsi, les ratios ATP/ADP et NADH/NAD régulent les activités IDH<sup>163</sup>. Au sein d'IDH2, l'isocitrate, le  $\text{Mg}^{2+}$  et le  $\text{NAD}^+$  se lient au site catalytique. Des études suggèrent l'existence d'un hétéro-dimère IDH1/IDH2, IDH1 apportant des résidus au site catalytique d'IDH2, tandis que les résidus analogues d'IDH2 participeraient à la liaison des ligands d'IDH1<sup>164</sup>.

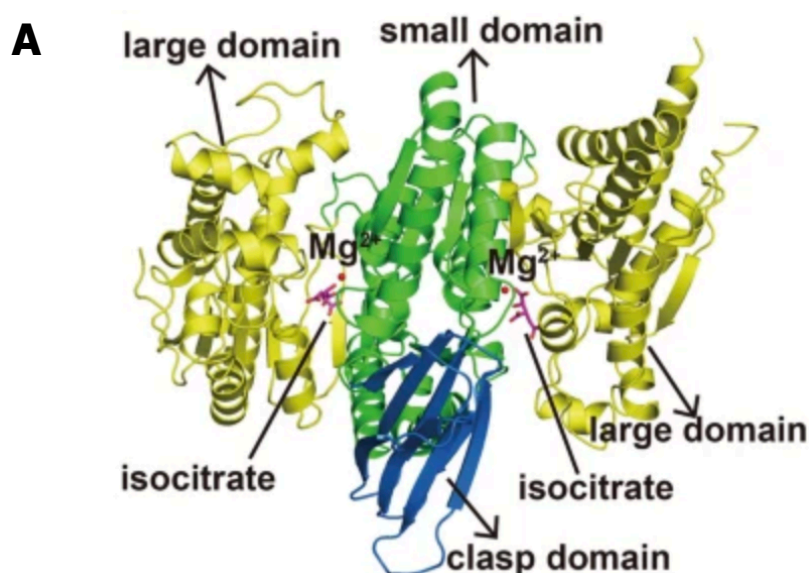
D'un point de vue structurel, chaque enzyme est composée de trois domaines : un grand domaine, un petit domaine et un domaine « clasp ». Le site actif est formé par les grands et petits domaines d'une sous-unité et par le petit domaine de l'autre sous-unité ; il comprend le site de liaison au  $\text{NADP}^+$  et aux ions  $\text{Mg}^{2+}$  et forme une structure hydrophile (**Figure 12A**). Dans la protéine IDH2, les résidus Thr117, Ser134, Arg140, Arg149, Lys251, Asp291, Asp314 et Asp318 ont été impliqués dans la liaison de l'isocitrate et du  $\text{Mg}^{2+}$  par

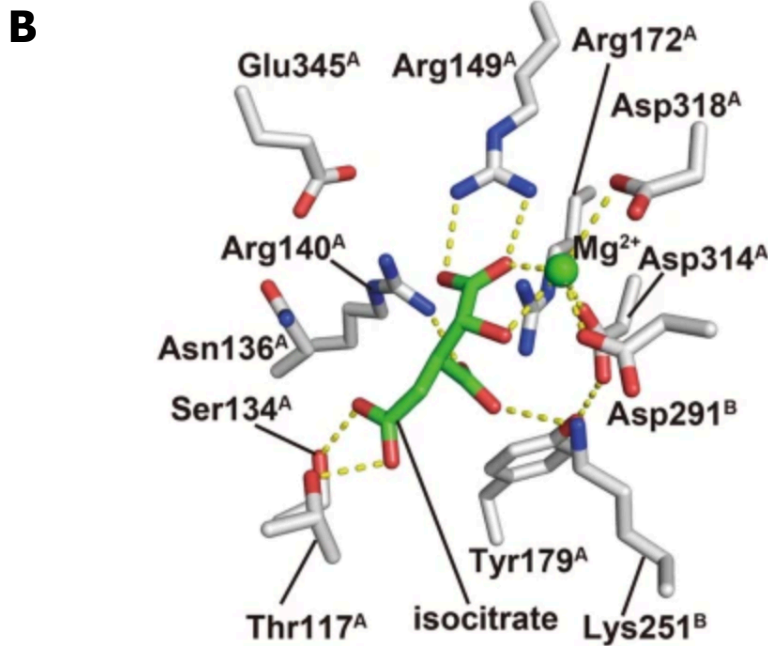
liaison hydrogène. Les résidus Arg140, Arg149, Arg172 et Lys251 stabilisent la liaison de l'isocitrate chargé négativement, tandis que les résidus Asp291, Asp314 et Asp318 stabilisent l'ion  $Mg^{2+}$  par des interactions électrostatiques<sup>165</sup> (**Figure 12B**).

Dans la protéine IDH1, les résidus Thr77, Ser94, Arg100, Arg109, Arg132, Tyr139, Asp275, Lys212, Thr214 et Asp252 ont été impliqués dans la liaison de l'isocitrate par liaison hydrogène ou par des interactions hydrophiles<sup>166</sup>.

La structure active de l'enzyme (isocitrate lié au site actif) est fermée, tandis que la structure inactive de l'enzyme est ouverte<sup>167</sup>. Dans la configuration inactive de l'enzyme IDH2, l'Asp279 forme des liaisons hydrogène avec le résidu Ser94 ; l'isocitrate rompt de manière allostérique les liaisons hydrogène entre ces résidus et permet au résidu Asp279 de chélater l'ion métallique, étape nécessaire à l'activation de l'enzyme<sup>168</sup>. Les enzymes IDH (hétéro-tétramère  $\alpha_2\beta\gamma$  et hétérodimère  $\alpha\gamma$ ) peuvent être aussi activées de manière allostérique par le citrate et l'ADP. La liaison du citrate induit des changements conformationnels au niveau du site allostérique qui sont transmis au site actif, conduisant à la stabilisation de la liaison de l'isocitrate au site actif et donc à l'activation de l'enzyme<sup>163</sup>.

Les protéines humaines IDH1 et IDH2 présentent une identité protéique de 42%<sup>169</sup>. Elles sont plus proches de l'enzyme d'E. coli spécifique du  $NADP^+$  (32% d'identité) que de celle de la levure (moins de 15% d'identité)<sup>169,170</sup>.





**Figure 12** : Enzyme IDH2

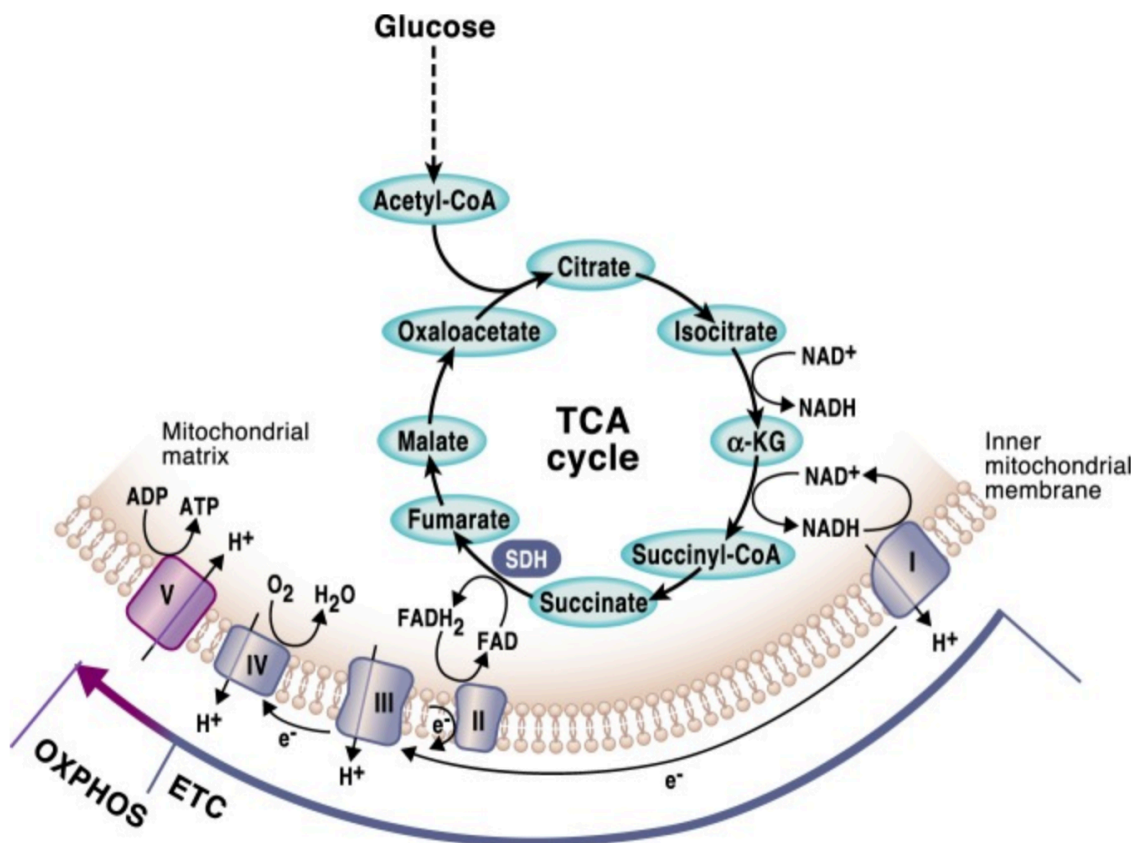
**A)** Domaines conservés ; le grand domaine (AA 40-152 et 327-452), le petit domaine (AA 153-180 et 224-326) et le domaine clasp (AA 181-223) sont représentés en jaune, vert et bleu, respectivement. **B)** Résidus impliqués dans la liaison à l'isocitrate (vert) et au  $Mg^{2+}$  (sphère verte). Les atomes d'azote (bleu) et d'oxygène (rouge), sont indiqués ; les liaisons hydrogène sont représentées par des lignes pointillées. Issue de Xu *et al.*, Sci Rep, 2017.

### 1.3.1.2. Couplage du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire

La glycolyse convertit une molécule de glucose en deux molécules de pyruvate et deux ions hydrogène. Le pyruvate est converti par l'enzyme pyruvate déshydrogénase (PDH) en acétyl coenzyme A (acétyl-CoA) qui entre dans le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA), également appelé cycle de Krebs, en condition d'aérobie. Ce cycle est une voie métabolique qui se déroule dans la matrice mitochondriale permettant la production d'ATP, essentiel au maintien de l'activité cellulaire. L'activité respiratoire mitochondriale est très dépendante des besoins cellulaires et il existe un dialogue entre mitochondries et noyau permettant d'adapter le métabolisme mitochondrial aux fonctions cellulaires complexes et exigeantes, comme la différenciation (induisant un programme d'expression génique) ou l'adaptation au stress. Grâce à une "signalisation rétrograde", les mitochondries régulent l'expression de gènes facilitant des processus cellulaires. Les activités mitochondriales sont aussi influencées par le microenvironnement<sup>171</sup>.

Les métabolites du cycle de Krebs sont transportés dans le cytosol où ils fournissent les éléments constitutifs de la synthèse des macromolécules entrant dans la synthèse des

nucléotides et des lipides ; pour exemple, le citrate est converti en oxaloacétate (OAA) et en acétyl-CoA (Ac-CoA)<sup>172</sup>. Une des fonctions du cycle de Krebs est d'oxyder l'Ac-CoA en deux molécules de CO<sub>2</sub>. L'achèvement du cycle génère des molécules d'ATP, du NADH et de la coenzyme flavine adénine dinucléotide (FAD) sous forme réduite (FADH<sub>2</sub>) qui alimentent le complexe I (NADH déshydrogénase) et le complexe II (succinate déshydrogénase, SDH) de la chaîne de transport des électrons de la mitochondrie. La SDH est la seule enzyme qui participe à la fois au cycle de Krebs et à la chaîne de transport des électrons. Les complexes I et II transmettent leurs électrons aux complexes III et IV qui convertissent l'O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O. La force motrice des protons créée par le mouvement des électrons est exploitée pour produire de l'ATP avec la participation du complexe V (ATP synthase)<sup>173</sup>. Ce processus nécessite la présence d'oxygène et est connu sous le nom de phosphorylation oxydative (OXPHOS) (**Figure 13**).



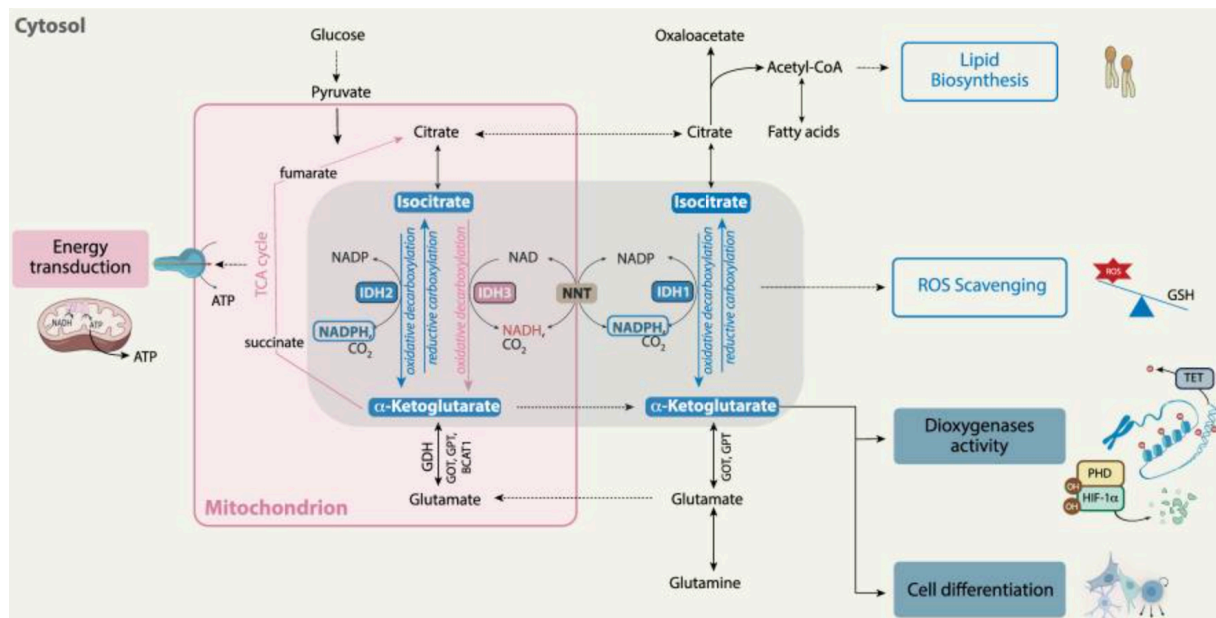
**Figure 13** : Cycle de Krebs et chaîne respiratoire

NADH et FADH<sub>2</sub> sont nécessaires pour le transfert des électrons à la chaîne respiratoire (ou chaîne de transport d'électrons, ETC). Les électrons sont acheminés à travers les complexes de la membrane mitochondriale interne ; la chaîne de transport d'électrons génère un potentiel de membrane mitochondriale utilisé pour produire de l'ATP. Les complexes mitochondriaux I et II de l'ETC reconstituent respectivement le NAD<sup>+</sup> et le

FAD, ce qui permet au cycle de Krebs de fonctionner. Abréviations :  $\alpha$ -KG, alpha-kétoglutarate ; SDH, succinate déshydrogénase ; OXPHOS, phosphorylation oxydative ;  $e^-$ , électron ;  $H^+$ , proton. Issue de Martinez-Reyes *et al.*, Nat Commun, 2020.

Le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative sont couplés par l'oxydation du NADH et du  $FADH_2$  dans les complexes I et II de la chaîne respiratoire mitochondriale. D'autres connections existent : le NADH inhibe les enzymes du cycle et en cas de dysfonctionnement de la chaîne respiratoire, le NADH qui s'accumule entraîne l'arrêt du cycle. Le NADH génère de l'ATP par le biais de la chaîne respiratoire, qui est un inhibiteur allostérique des enzymes pyruvate déshydrogénase (PDH) et IDH. Lorsque les cellules disposent de suffisamment de NADH et d'ATP, le cycle ralentit. En revanche, une forte demande d'ATP, en augmentant le ratio ADP/ATP et le niveau d'AMP, entraîne une activation des enzymes du cycle. L'Ac-CoA en abondance inhibe l'enzyme PDH mais active la pyruvate carboxylase (PC), augmentant la formation d'OA à partir du pyruvate et ainsi coordonnant les niveaux des deux métabolites initiateurs du cycle de Krebs. Un autre régulateur intrinsèque est le succinyl-CoA, qui inhibe à la fois la citrate synthase (CS) et l'enzyme  $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase ( $\alpha$ -KGDH) pour ralentir le cycle. De même, une augmentation de l'OA inhibe l'enzyme SDH et conduit à un ralentissement du cycle<sup>172</sup>.

Les 3 enzymes IDH participent à des activités métaboliques pour certaines différentes. Selon l'isoforme, le cofacteur et la localisation, les enzymes IDH sont associées à la production d'énergie (mitochondrie), au maintien du potentiel redox<sup>161</sup>, au métabolisme de la glutamine, aux processus de lipogénèse et épigénèse et la réponse à l'hypoxie par la modification des niveaux d' $\alpha$ KG et l'activité de dioxygénases dépendantes de ce cosubstrat<sup>174</sup> (**Figure 14**).



**Figure 14** : Processus biologiques associés aux activités des enzymes IDH

Abréviations : GDH, glutamate déshydrogénase ; GOT (ou AST), aspartate aminotransférase ; GPT (ou ALT), alanine aminotransférase ; BCAT1, branched-chain aminotransférase 1 ; GSH, glutathion réduit ; ROS, espèces réactives de l'oxygène ; TET, ten eleven translocation ; PHD, prolyl hydroxylase domain ; HIF-1 $\alpha$ , hypoxia inducible factor 1 subunit alpha. Issue de Alzial *et al.*, Oncogene, 2022.

IDH1 participe au contrôle de la consommation de glucose. Des souris transgéniques surexprimant *IDH1* présentent une hyperlipidémie et une obésité<sup>175</sup>. Inversement, l'inactivation *in vivo* d'*IDH1* entraîne une réduction de la masse grasseuse et une baisse des triglycérides circulants<sup>176</sup>. La perte d'expression d'*IDH1* dans les îlots pancréatiques chez la souris altère la sécrétion d'insuline, augmente la production de lactate<sup>177</sup>, favorise l'incorporation du glucose dans les acides gras et modifie le cycle NADPH/NADP<sup>+</sup><sup>178</sup>. Il a été proposé que IDH1 fonctionne dans un cycle anaplérotique du pyruvate régulant ce processus<sup>178</sup>. IDH1 a aussi été impliqué dans la régulation du métabolisme lipidique<sup>168</sup> : dans le tissu neural, IDH1 régule le métabolisme des phospholipides dans les astrocytes en développement<sup>179</sup>.

IDH2 est principalement impliquée dans la respiration mitochondriale par son rôle dans le cycle de Krebs et ce, dans tous les tissus<sup>168</sup>. Dans le cœur et le foie des mammifères, IDH2 catalyse la réaction de conversion de l' $\alpha$ KG et du NADPH en isocitrate et NADP<sup>+</sup> dans des conditions normoxiques<sup>180</sup>.

La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) est classiquement considérée comme l'enzyme fournissant du NADPH, précurseur du glutathion<sup>181-183</sup> qui est lui requis dans le maintien du potentiel redox. Cependant, les enzymes IDH sont aussi impliquées dans la production de NADPH réduit<sup>184,168</sup>. En fournissant du NADPH aux enzymes antioxydantes dépendantes de ce coenzyme, les enzymes IDH maintiennent le niveau de glutathion réduit (GSH)<sup>185,186</sup>, de thiorédoxine<sup>187</sup> et de catalase (CAT)<sup>188</sup>, permettant de contrer la formation des espèces oxygénées réactives (ROS)<sup>189</sup>.

L'activité des enzymes IDH augmente en réponse à une variété de dommages oxydatifs. Cependant, ces enzymes peuvent aussi être inactivées par les produits de peroxydation lipidique<sup>190</sup> (processus au cours duquel les radicaux libres prennent un électron aux phospholipides situés dans la membrane<sup>191</sup>) et par les ROS<sup>192</sup>. Ces processus sont médiés par plusieurs types de modifications, comme la glutathionylation (en présence de niveaux élevés de glutathion oxydé)<sup>193</sup>, la S-nitrosylation (en présence d'espèces azotées réactives)<sup>194</sup> et la glycation non enzymatique en présence de niveaux élevés de glucose<sup>195</sup>. En accord avec cette observation, une déficience en IDH1 ou IDH2 entraîne une augmentation de la peroxydation lipidique, des lésions oxydatives de l'ADN, la génération de peroxyde intracellulaire, ce qui se traduit par une survie cellulaire altérée<sup>196</sup>. En cas de dommages oxydatifs, d'autres enzymes du cycle de Krebs ( $\alpha$ -KGDH, IDH3) voient aussi leur activité diminuer<sup>173,168</sup>.

De façon plus anecdotique, IDH1 est associé à la protection contre la mort cellulaire après une phototoxicité induite par les ultraviolets B<sup>197</sup>. IDH2 protège de l'apoptose après un choc thermique<sup>198</sup>, un traitement par le facteur tumor necrosis factor (TNF $\alpha$ )<sup>199</sup>, ou encore une exposition à des rayonnements ionisants<sup>200</sup>.

De façon générale, les coenzymes NAD(P)<sup>+</sup>/NAD(P)H sont essentielles à une multitude de processus et fonctions cellulaires (homéostasie du calcium, dégradation des lipides, expression génétique, fonctions immunologiques, vieillissement...) <sup>162,201</sup>. C'est pourquoi les enzymes IDH sont associées à de nombreux mécanismes.

### *1.3.1.3. Les multiples sources et fonctions de l' $\alpha$ KG*

Outre sa production par les enzymes IDH, une source majeure d' $\alpha$ KG est le L-glutamate, par le biais de l'activité GDH qui utilise les coenzymes NAD<sup>+</sup> ou NADP<sup>+</sup> ; cette réaction correspond à une réaction de transamination. Le glutamate peut être métabolisé en



glutamine par la glutamine synthase (GS)<sup>202,203</sup>. Par conséquent, GDH et GS modulent indirectement le niveau d' $\alpha$ KG<sup>204</sup>. Pour répondre au besoin d' $\alpha$ KG pendant le stress oxydatif, ces transaminases sont surexprimées<sup>174</sup>. La réaction inverse produisant du glutamate à partir d' $\alpha$ KG est cruciale pour les cellules neurales qui utilisent le glutamate comme neurotransmetteur. Dans le tissu neural, la réaction de transamination, en consommant de l'ammoniac (lié à la désamination oxydative du L-glutamate catalysée par la GDH qui élimine le groupement  $\alpha$ -aminé sous forme de  $\text{NH}_4^+$ ) permet d'éliminer une accumulation toxique de ce composé. Par conséquent, l' $\alpha$ KG présente des propriétés neuroprotectrices. Le métabolisme du succinate peut également produire de l' $\alpha$ KG à travers un cycle de Krebs réducteur (inverse du cycle oxydatif qui caractérise le cycle de Krebs de façon classique), comme cela a été montré chez les micro-organismes anaérobies lors de pressions partielles élevées en  $\text{CO}_2$ . En plus des activités citrate lyase (qui catalyse la transformation du citrate en OA) et fumarate réductase (qui catalyse la transformation du fumarate en succinate), ce cycle de Krebs réducteur met en jeu l' $\alpha$ KG synthase qui produit de l' $\alpha$ KG à partir du succinyl-CoA<sup>205</sup>. Par ailleurs, il a été montré chez les bactéries, qu'il existe d'autres sources d' $\alpha$ KG. Le succinate semi-aldéhyde résultant de l'oxydation du succinate, réaction médiée par la succinate semi-aldéhyde déshydrogénase, peut contribuer à la synthèse de l' $\alpha$ KG. L' $\alpha$ KG décarboxylase catalyse la conversion du succinate semi-aldéhyde en  $\alpha$ KG avec une incorporation de  $\text{CO}_2$  dans les bactéries *Pseudomonas fluorescens*<sup>206</sup>. Les bactéries *Agrobacterium tumefaciens* et *Pseudomonas acidovorans*, peuvent aussi utiliser l'acide galacturonique ou l'acide glucuronique pour produire de l' $\alpha$ KG à travers une série de réactions<sup>207,208</sup>.

L'importance de ce co-substrat et de sa concentration intracellulaire sont en particulier illustrées dans le cas des cellules souches embryonnaires (ES), qui présentent un niveau élevé d' $\alpha$ KG. L' $\alpha$ KG, en influant sur les activités enzymatiques d'acteurs majeurs de l'épigénèse (dont la protéine TET2) maintient un niveau de méthylation des histones et de l'ADN permettant l'expression des programmes géniques liés à l'auto-renouvellement et la pluripotence de ces cellules<sup>209</sup>.

#### 1.3.1.3.1. Fonction antioxydante

L' $\alpha$ KG exerce des propriétés anti-oxydantes, en participant aux activités de la superoxyde dismutase (SOD), CAT et la glutathion peroxydase (GSH-Px)<sup>210</sup>. La fonction antioxydante de l' $\alpha$ KG est conservée chez les bactéries<sup>211</sup> et l'homme<sup>212</sup>. En raison de la présence d'un

groupe cétone, l' $\alpha$ KG capture aussi les espèces RONS (reactive oxygen and nitrogen species) et neutralise le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le superoxyde et d'autres espèces réactives générées par la décarboxylation oxydative<sup>213,214</sup>. L' $\alpha$ KG réagit avec les RONS et forme du succinate dans une réaction qui génère une molécule d' $H_2O$  et du  $CO_2$ <sup>215,216</sup>.

#### 1.3.1.3.2. Co-substrat de nombreuses dioxygénases cellulaires

L' $\alpha$ KG est le co-substrat de nombreuses dioxygénases cellulaires<sup>174</sup>. Ce groupe d'enzymes phylogénétiquement conservées catalyse des réactions d'hydroxylation sur les protéines, les acides nucléiques, les lipides et les intermédiaires métaboliques<sup>217</sup>. Ces enzymes utilisent l' $O_2$ , qui fournit l'atome d'oxygène pour l'hydroxylation du fer divalent ( $Fe^{2+}$ ) et de l' $\alpha$ KG ; elles fournissent un produit hydroxylé, du  $CO_2$  et du succinate. En permettant la réduction du  $Fe^{3+}$  (oxydé) en  $Fe^{2+}$  (réduit), l'acide ascorbique (vitamine C) module ces réactions.

Les dioxygénases participent à des processus cellulaires très variés. Elles comprennent par exemple des prolyl-hydroxylase (PHD) qui participent à la réponse à l'hypoxie et des déméthylases qui modifient le statut de méthylation des histones et de l'ADN, notamment les histones déméthylases de la famille Jumonji (KDM)<sup>161,162,172</sup> et les membres de la famille TET (cf. *infra*). L'activité enzymatique de TET2 est augmentée par l'ajout de vitamine C dans des modèles pré-cliniques<sup>218,219</sup> ; cependant, la vitamine C administrée par voie orale n'atteint généralement pas une concentration suffisamment élevée pour modifier de manière significative la fonction TET2.

Dans ce cadre, l' $\alpha$ KG joue également un rôle clé dans le métabolisme des AA, processus qui est essentiel dans tous les tissus. Lors de la dégradation des AA (qui a lieu dans le foie chez l'homme), le groupement alpha aminé est séparé du squelette carboné. Cette première étape catabolique est assurée par des aminotransférases. Ces réactions de transamination assurent les échanges d'azote entre les AA et les acides  $\alpha$ -cétoniques : l'AA, donneur du groupement amine, devient un acide  $\alpha$ -cétonique tandis que l'acide  $\alpha$ -cétonique accepteur devient un acide  $\alpha$ -aminé. Dans le foie, l'acide  $\alpha$ -cétonique accepteur du groupe amine est l' $\alpha$ KG, l'AA ainsi formé est le L-glutamate. L' $\alpha$ KG peut par exemple servir de précurseur à l'AA proline<sup>220</sup>, qui est formé à partir de pyrroline-5-carboxylate (P5C), métabolite intermédiaire entre la glutamine, l'ornithine et la proline. Par une production accrue de proline et d'hydroxyproline, l' $\alpha$ KG contribue à la formation du tissu

osseux<sup>221</sup>.

#### 1.3.1.3.3. Rôle dans l'inflammation

Dans les macrophages activés par l'IL-4, l' $\alpha$ KG produit par la glutaminolyse, réprime la réponse pro-inflammatoire en inhibant l'activation de la kinase IKK $\beta$ , effecteur de la voie inflammatoire des facteurs nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)<sup>222</sup>. En effet, l'hydroxylation de IKK $\beta$  sur ses résidus proline est dépendante de l'activité de l'enzyme prolyl-hydroxylase (PHD), utilisant l' $\alpha$ KG comme co-substrat.

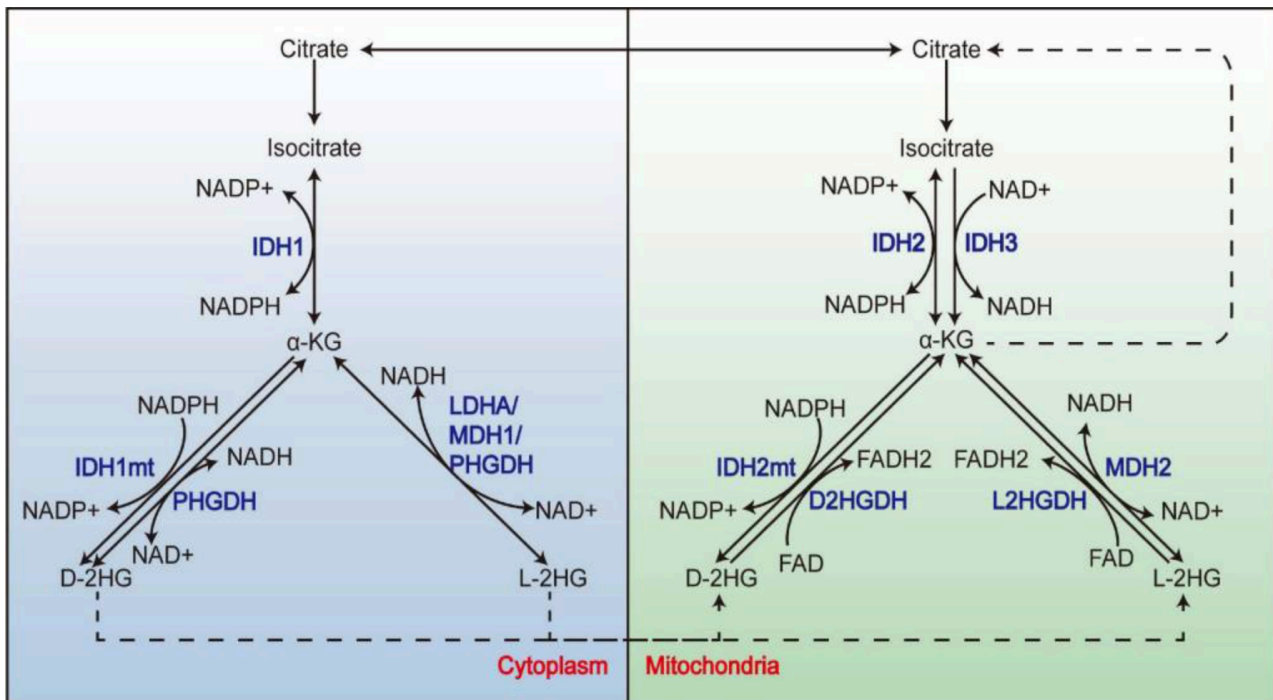
### 1.3.2. Mutations des gènes *IDH*

Les mutations *IDH* mettent en évidence l'implication directe d'une dérégulation du métabolisme énergétique dans le processus de transformation cellulaire. Cette implication avait déjà été illustrée par les mutations des gènes *SDH* (5 sous-unités composent l'activité SDH, codées par 5 gènes) identifiées dans les phéochromocytomes et les paragangliomes familiaux et sporadiques<sup>223</sup>, et les mutations du gène *fumarate hydratase* (*FH*, activité qui catalyse la formation du malate à partir du fumarate) impliquées dans des tumeurs de type léiomyomes (cutanés et utérins) et des tumeurs du rein<sup>224</sup>.

Les mutations *IDH* sont essentiellement hétérozygotes. Ce sont des mutations faux-sens conduisant à la substitution d'acides aminés jouant un rôle clé dans la liaison de l'isocitrate au site actif (Arg140 ou Arg172 pour IDH2 ; Arg132 pour IDH1, codon analogue de Arg172 d'IDH2). Ces mutations affectent la liaison des coenzymes (affinité accrue pour le NADPH) et la conformation du site actif. Ces mutations gain de fonction imposent aux enzymes IDH une nouvelle activité de réduction de l' $\alpha$ KG en 2-hydroxyglutarate de forme D (D-2HG), cette réaction est accompagnée de l'oxydation du coenzyme réduit NADPH en forme oxydée NADP<sup>+</sup><sup>225,226</sup>. La production d'oncométabolite D-2HG semble être la seule conséquence de l'activité des formes mutantes IDH (ces mutations n'induisent pas la synthèse du métabolite L-2HG.). Il a été proposé que ces mutations n'affectent pas la concentration intracellulaire en  $\alpha$ KG. Cependant, ce métabolite étant instable et difficile à doser, la question de sa concentration dans les cellules exprimant une mutation *IDH* se pose.

Le métabolite D-2HG est un métabolite produit de façon physiologique par les cellules mais dont les fonctions sont encore mal connues. Il s'accumule dans les cellules exprimant une forme mutante IDH, par saturation de la réaction inverse (D-2HG en  $\alpha$ KG) qui est assurée par l'enzyme D-2HG déshydrogénase (D2HGDH) (**Figure 15**). Chez les patients atteints de LAM avec mutation *IDH*, la concentration sérique en D-2HG est très supérieure à son taux physiologique (2,4-305,9 $\mu$ mol/L vs. 0,7-2,2 $\mu$ mol/L). La disponibilité en  $\alpha$ KG et la nature de l'anomalie *IDH* (*IDH1* vs. *IDH2* ; *IDH2*<sup>R140</sup> vs. *IDH2*<sup>R172</sup>) influent sur la production du D-2HG ; une concentration plus faible d' $\alpha$ KG dans le cytosol comparée à la mitochondrie expliquerait une moindre accumulation de D-2HG dans le cas des mutations *IDH1* (*IDH1m*) comparées aux *IDH2m*<sup>227</sup>. Le taux sérique de D-2HG est un biomarqueur prédictif de la présence de mutations *IDH* dans les hémopathies<sup>228,227,229</sup> (faiblement corrélé à la charge allélique et la masse tumorale<sup>227</sup>) et dans des tumeurs solides<sup>230,231</sup>. Dans la LAM, cet oncométabolite a été cliniquement validé comme oncobiomarqueur de la réponse au traitement et de la maladie résiduelle<sup>227,228</sup>.

Plusieurs activités enzymatiques sont impliquées dans le métabolisme des deux énantiomères du 2HG, L et D (aussi indiqués S et R dans les nomenclatures anglophones) (**Figure 15**). Les isoformes cytosolique (MDH1) et mitochondriale (MDH2) de l'enzyme malate déshydrogénase réduisent l' $\alpha$ KG en L-2HG dans ces deux compartiments cellulaires<sup>232</sup>. L'enzyme LDHA, en condition acide, produit du L-2HG<sup>233</sup>. L'enzyme phosphoglycérate déshydrogénase (PHGDH) qui catalyse la première étape de biosynthèse *de novo* des sérines et qui est fréquemment surexprimée dans les cancers<sup>234</sup>, possède également la propriété de produire du D-2HG à partir de l' $\alpha$ KG dans le cytosol<sup>235</sup>. Les métabolites L-2HG et D-2HG mitochondriaux sont reconvertis en  $\alpha$ KG par les enzymes L-2HG déshydrogénase (L2HGDH)<sup>236</sup> et D-2HG déshydrogénase (D2HGDH)<sup>237</sup> qui utilisent le FAD comme accepteur d'électrons pour effectuer l'oxydation du 2-HG, et générer de l' $\alpha$ KG et du FADH<sub>2</sub>.



**Figure 15** : Métabolisme des formes D et L du 2HG

Abréviations :  $\alpha$ -KG, alpha-kétoglutarate ; LDHA, lactate déshydrogénase A ; MDH1, malate déshydrogénase 1 ; MDH2, malate déshydrogénase 2 ; PHGDH, phosphoglycérate déshydrogénase ; D2HGDH, D2HG déshydrogénase ; L2HGDH, L2HG déshydrogénase. Issue de Du *et al.*, Front Cell Dev Biol, 2021.

La parenté structurelle entre le D-2HG et l' $\alpha$ KG dont il est issu, fait que le D-2HG se comporte comme un inhibiteur compétitif (faible) de l' $\alpha$ KG, et inhibe fonctionnellement des dioxygénases dépendantes du co-substrat  $\alpha$ KG. Un important excès de D-2HG est cependant nécessaire (jusqu'à 100 fois la concentration d' $\alpha$ KG) pour provoquer un effet inhibiteur significatif. Cette faible capacité à l'inhibition peut s'expliquer par le fait que le groupe hydroxyle du D-2HG est un ligand plus faible que le groupe cétone de l' $\alpha$ KG vis-à-vis du  $\text{Fe}^{2+}$ . La faible efficacité inhibitrice du D-2HG explique également pourquoi les cellules tumorales peuvent tolérer un taux élevé de D-2HG<sup>238</sup>. Le L-2HG est 5 à 10 fois plus puissant que le D-2HG dans l'inhibition de certaines dioxygénases, dont TET2<sup>238</sup>.

## 1.4. Conséquences des mutations *IDH*

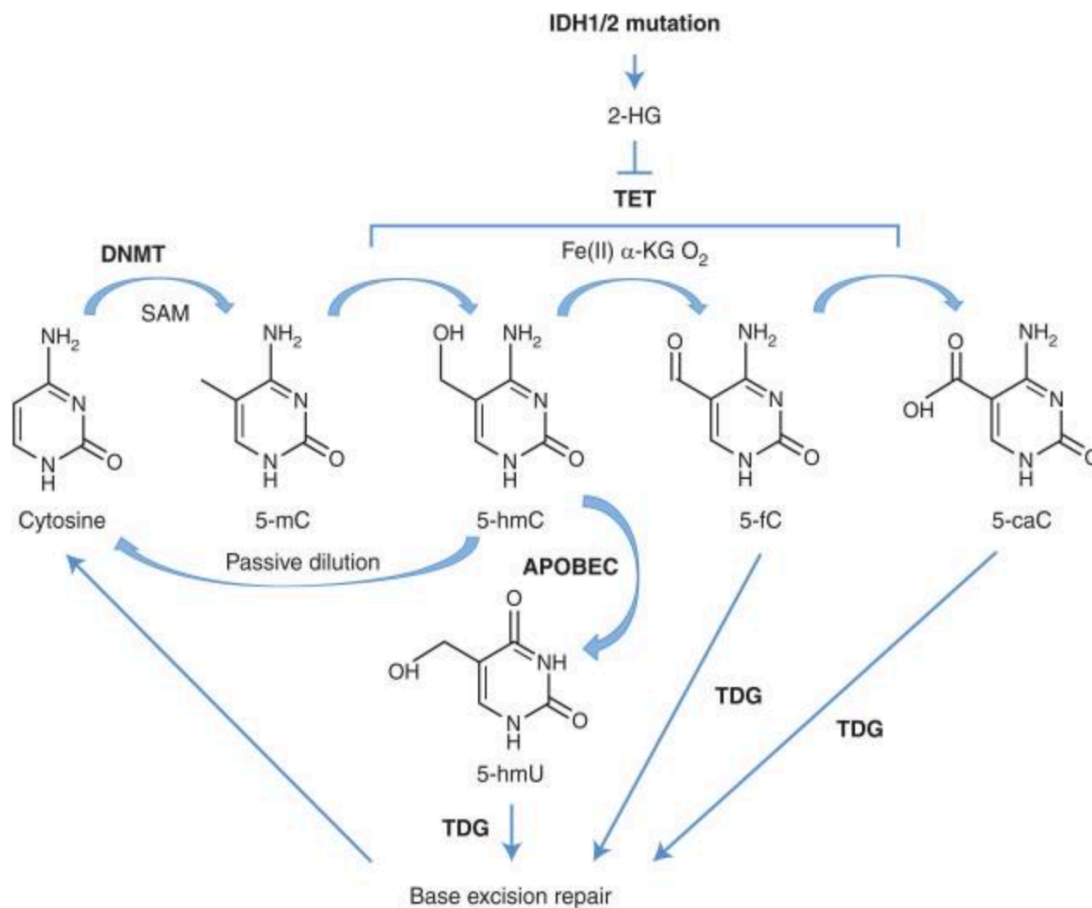
### 1.4.1. Altérations épigénétiques liées aux mutations *IDH*

#### 1.4.1.1. Méthylation de l'ADN

La (dé)méthylation de l'ADN est l'une des modifications épigénétiques les mieux caractérisées<sup>239</sup>. L'ADN est méthylé sur résidus cytosine (5-méthylcytosine, 5mC) par l'activité des ADN méthyltransférases (DNMT). Les enzymes TET (TET1/2/3) à l'inverse, hydroxylient le groupe méthyl des résidus 5mC en 5-hydroxyméthyl (5hmC), ce qui est une des étapes clé du cycle de déméthylation active de l'ADN<sup>240,241</sup> (**Figure 16**). La distribution de la marque 5hmC à l'échelle du génome reflète la forte association de l'activité enzymatique TET avec la transcription des gènes. Cette marque est enrichie au niveau des régions enhancers (gènes actifs), dans le corps de gènes les plus transcrits<sup>242-244</sup>. Elle joue un rôle clé au cours du développement et dans le contrôle de la différenciation cellulaire en contrôlant l'expression de gènes de maintenance de la pluripotence<sup>245</sup>. Cette marque régule la conformation de la chromatine au niveau des enhancers, l'état de méthylation des histones par son interaction avec des modificateurs de la méthylation et de l'acétylation des histones.

La perte de fonction TET, en bloquant le cycle de déméthylation, entraîne une diminution globale en contenu 5hmC et une augmentation en contenu 5mC. Les nombreux modèles murins de perte de fonction de *Tet2* montrent une diminution importante de marques 5hmC sur les enhancers, ce qui entraîne l'hyperméthylation et l'hypo-activité de ces éléments et une mise en route retardée des premières étapes de la différenciation des cellules, phénomènes associés à la transformation des cellules myéloïdes<sup>246</sup>. Ces observations plaident pour un rôle clé de TET2 et de la marque 5hmC dans la dynamique de méthylation/déméthylation des éléments de régulation génique liés à la différenciation myéloïde. Cette hyperméthylation s'opère au niveau des séquences liant le répresseur transcriptionnel CCCTC-binding factor (CTCF) qui a aussi une activité d'isolateur chromatinien (insulator), ce qui indique que l'activité TET façonne aussi l'environnement chromatinien local au niveau des enhancers. Des facteurs de transcription importants dans la différenciation et la spécification cellulaire recrutent physiquement la protéine TET2 sur la chromatine (TET2 est dépourvu de domaine d'interaction avec l'ADN, contrairement à TET1 et TET3), notamment la protéine à homéo-domaine NANOG<sup>247</sup>, spalt like transcription factor 4 A (SALL4A)<sup>248</sup>, WT1<sup>53,54</sup>, early B-cell transcription factor 1 (EBF1)<sup>249</sup>, SPI1/PU.1<sup>250</sup>, CCAAT enhancer-binding protein alpha (CEBPA)<sup>251</sup> et le facteur de transcription E2A<sup>252</sup>. Il

existe des interactions entre les protéines TET et les complexes de glycosylation des protéines (notamment la protéine O-linked N-acetyl-glucosaminyltransferase, OGT) et des protéines de modification des histones, comme les activités antagonistes Polycomb et Trithorax (PcG et trxG) qui sont des facteurs chromatinien très conservés au cours de l'évolution. En conséquence, les déficiences d'expression ou d'activité en enzymes TET, et notamment TET2, altèrent la différenciation cellulaire observée dans les systèmes neuronaux et hématopoïétiques<sup>253</sup>.



**Figure 16** : Déméthylation active de l'ADN

Les ADN méthyltransférases (DNMT) utilisent le donneur de groupe methyl S-adénosyl méthionine (SAM). Les protéines TET (ten eleven translocation) catalysent l'oxydation des résidus 5-méthylcytosine (5mC) en 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC), puis séquentiellement contribuent à la formation des résidus 5-formylcytosine (5fC) et 5-carboxylcytosine (5caC). Les activités TET sont inhibées par l'accumulation d'oncométabolite D-2HG. Les résidus oxydés 5fC et 5caC sont les substrats de l'activité de la thymine ADN glycosylase (TDG) et le site abasique en résultant est pris en charge par les complexes d'excision de base (ou base excision repair, BER) qui rétablissent un résidu cytosine non modifié. Issue de Bowman *et al.*, Cold Spring Harb Perspect Med, 2017.

*TET2* est un gène fréquemment muté dans les hémopathies malignes humaines<sup>254</sup>. La contribution des anomalies *Tet2* au processus de transformation des cellules myéloïdes et lymphoïdes a été très largement étudiée en modèles murins<sup>255,256,257</sup>.

Dans les cellules hématopoïétiques, les mutations *IDH* induisent une hyper-méthylation de l'ADN liée à l'inhibition fonctionnelle de *TET2* ; ainsi la perte de fonction de *TET2* mime une accumulation de D-2HG<sup>218,258</sup>. Les régions riches en îlots CpG sont affectées, ce qui a conduit certains auteurs à évoquer un phénotype appelé CpG island methylator phenotype (CIMP) initialement décrit dans des tumeurs solides incluant les gliomes. Le processus d'hyper-méthylation qui affecte l'ADN s'accompagne d'une modification profonde du profil transcriptionnel et a des conséquences fonctionnelles majeures pour le développement des cellules hématopoïétiques. Par exemple, on observe une augmentation du contingent de cellules immatures médullaires dans les souris knock-in *Idh2<sup>R140Q</sup>* ou déficientes pour *Tet2* et de multiples anomalies de la différenciation myéloïde dans ces deux contextes cellulaires<sup>258</sup>. Dans le cas de *Idh2<sup>R10Q</sup>*, ces modifications géniques sont aussi la conséquence de l'inhibition fonctionnelle d'histones déméthylases (cf. *infra*).

*TET2* est une protéine qui interagit également avec l'ARN<sup>259,260</sup>. Au cours de l'engagement en différenciation des cellules murines ES, l'hydroxy-méthylation médiée par Tet1 et Tet2 diminue, réduisant la stabilité de transcrits codant pour des facteurs importants pour le maintien de la pluripotence<sup>260</sup>. Il est aujourd'hui établi que les modifications de méthylation des ARNs affectent aussi leur traduction<sup>261,262</sup>. Le contrôle exercé par les protéines TET sur la stabilité et la traductibilité de l'ARN représente une nouvelle voie par laquelle les mutations *IDH* et la perte de la fonction de *TET2* pourraient influencer la physiopathologie et la transformation cellulaire.

#### 1.4.1.2. Méthylation des histones

Plusieurs histones déméthylases sont fonctionnellement inhibées par le D-2HG induisant l'hyperméthylation de leurs résidus lysine cibles sur l'histone 3 (H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79)<sup>238,263</sup>. Ces modifications affectent la différenciation cellulaire. En effet, cette hyperméthylation compromet la différenciation des cellules mésenchymateuses par l'incapacité du facteur MyoD à interagir avec ses gènes cibles<sup>264</sup> ; l'inhibition de l'activité de la lysine demethylase 4C (KDM4C) compromet la différenciation des adipocytes<sup>265</sup>. En cas de mutation *IDH*, les modifications de méthylation des histones précèdent celles observées sur l'ADN<sup>265,266</sup>, suggérant une certaine « indépendance » des deux



phénomènes, à la fois dans leur établissement et possiblement en terme de conséquences fonctionnelles et de contribution au processus de transformation.

#### 1.4.1.3. Réparation de l'ADN

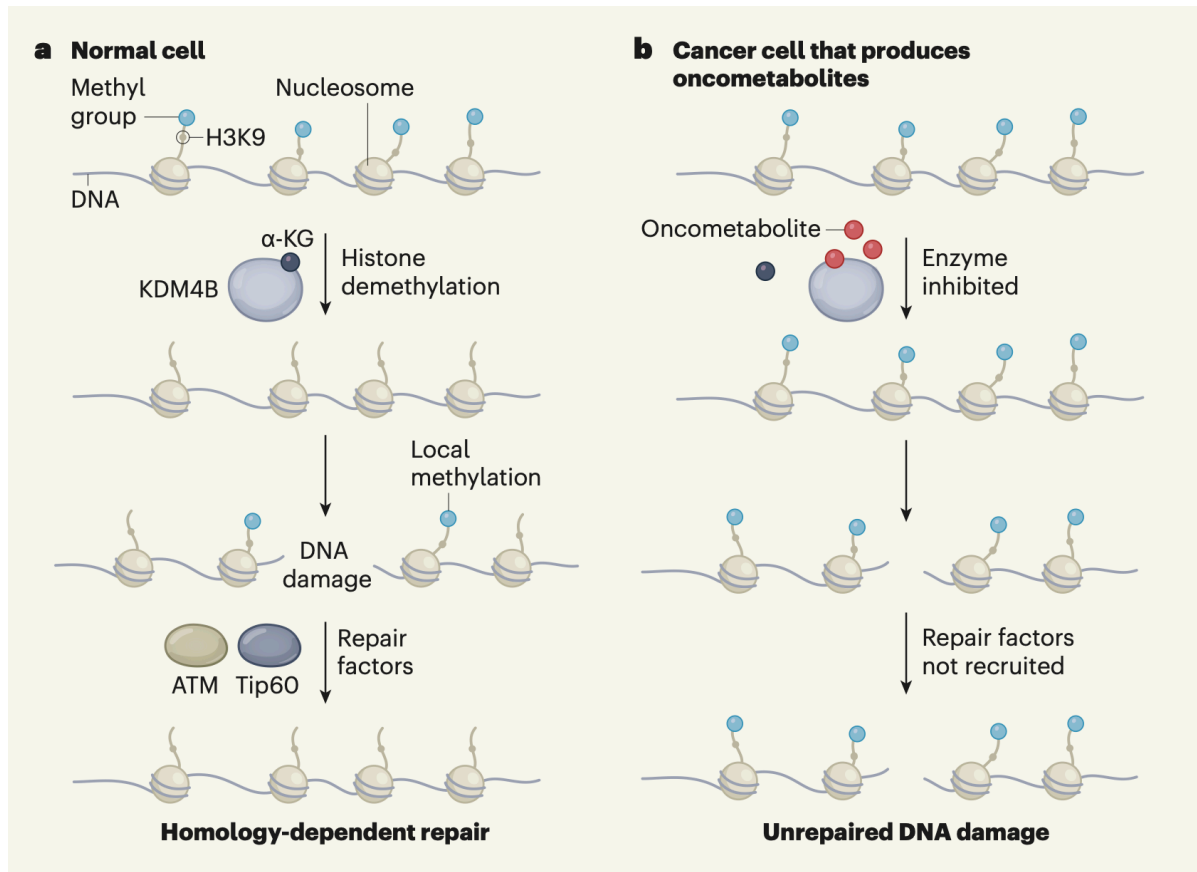
Les mutations *IDH* induisent un défaut de réparation des cassures de l'ADN impliquant notamment le mécanisme de recombinaison homologue (homologous recombinaison, RH)<sup>267,141</sup>. Dans le cas des LAM *IDHm*, il a été proposé que ce phénotype soit lié à une diminution de l'expression du gène *ataxia telangiectasia mutated (ATM)*<sup>268</sup>, facteur clé de la RH par son recrutement et activation de la machinerie de réponse aux dommages de l'ADN<sup>142,271</sup>. Sans être mutuellement exclusif, il a récemment été montré que l'inhibition des deux histone déméthylases KDM4A et KDM4B par le D-2HG dans les cellules *IDHm* entraîne l'hyperméthylation des résidus H3K9 (H3K9me3) sur l'ensemble de la chromatine, rendant inopérante la concentration de la marque H3K9me3 à des sites de cassure double brin de l'ADN. Normalement, la signalisation par cette marque permet la réparation des cassures par le recrutement d'ATM et Tip60<sup>141</sup> (**Figure 17A**).

De façon intéressante, les gliomes *IDH1m* sont aussi souvent associés à un défaut de réponse aux dommages de l'ADN par la perte d'expression d'*ATR*, qui participe aux réparations par d'autres mécanismes<sup>272</sup>. Les sensibilités aux dommages à l'ADN et les processus de réparation des cellules neurales ou hématopoïétiques exprimant une mutation *IDH* mettent en jeu des processus souvent différents<sup>273</sup>. Des défauts de réparation ont aussi été observés dans le cas de la perte de fonction *TET2* dans les cellules leucémiques<sup>274</sup>. Le défaut de RH entraîne un phénotype dit "BRCAness" (par analogie avec le défaut de recombinaison homologue induit par les anomalies des gènes *BRCA*) et une hyper-sensibilité des cellules leucémiques et neurales *IDHm* aux inhibiteurs de l'enzyme poly(ADP-ribose)polymérase 1 (PARP1)<sup>267</sup>, selon le principe de létalité synthétique associé à la double inhibition des activités BRCA et PARP. Cette vulnérabilité aux thérapies inhibitrice de PARP1 (comme l'Olaparib), si elle était confirmée, serait intéressante d'un point de vue clinique<sup>275</sup>. En effet, les inhibiteurs PARP1 sont couramment utilisés en routine clinique dans des contextes tumoraux variés (cancer de l'ovaire, de la prostate...). La combinaison des inhibiteurs de PARP avec des inhibiteurs de la kinase ataxia telangiectasia and Rad3-related protein kinase (ATR) montre une forte activité anti-tumorale *in vitro* et *in vivo* en favorisant l'apoptose cellulaire<sup>275</sup>.

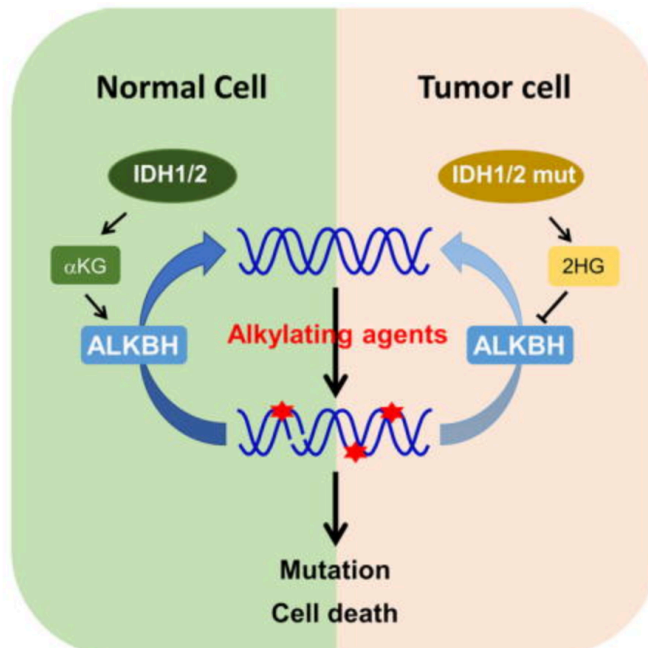
Un autre exemple est celui des dioxygénases dépendantes de l' $\alpha$ KG de la famille AlkB homolog (ALKBH) impliqués dans la réparation de l'ADN, simple ou double brin, et qui

oxydent les groupes alkyle des résidus lésés 1-méthyladénine (m1a) et 3-méthylcytosine (m3c) induites par les agents alkylants<sup>276</sup>. Le D-2HG inhibe les enzymes ALKBH2 et ALKBH3 et contribue à une augmentation du taux de mutations<sup>277,278</sup>. La déficience de la réparation de l'ADN en contexte *IDHm* mérite d'explorer l'utilisation d'agents alkylants (comme le busulfan) pour promouvoir la mort cellulaire. (**Figure 17B**).

**A**



**B**



**Figure 17** : Mécanismes de réparation de l'ADN impactés par les mutations *IDH*

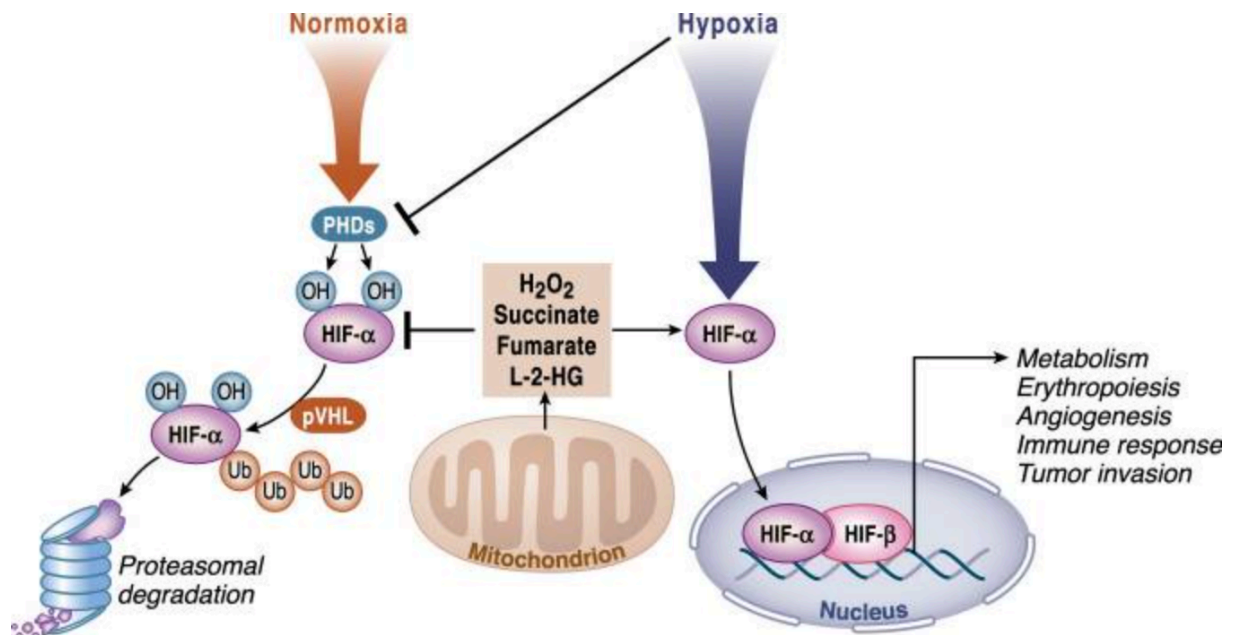
**A)** (a) La présence d'une cassure double brin de l'ADN dans une cellule normale est signalisée au niveau du site endommagé par la marque H3K9me3 ; ce signal de méthylation local recrute les facteurs de réparation de l'ADN, notamment les protéines Tip60 et ATM (ataxia telangiectasia mutated). (b) Dans le contexte *IDHm*, l'hyperméthylation globale des résidus H3K9 masque les pics locaux de méthylation survenant après une lésion de l'ADN, et entrave le recrutement des facteurs de réparation de l'ADN. Les cassures double brin en particulier sont à l'origine de recombinaisons chromosomiques et d'une forte instabilité génétique. Issue de <sup>141</sup>. **B)** Sensibilité aux agents alkylants des cellules *IDHm*. Issue de Wang *et al.*, Cell Rep, 2015.

Une autre particularité phénotypique a été rapportée dans le cas des gliomes *IDH1m*, liant la présence de la mutation *IDH1* à l'induction de dommages à l'ADN, et pouvant offrir là encore une opportunité thérapeutique<sup>279</sup>. En effet, la voie de synthèse *de novo* des pyrimidines, lorsqu'elle est déficiente, induit un déséquilibre du pool de nucléotides et des dommages de l'ADN. Cette voie est en partie contrôlée par l'enzyme dihydroorotate dehydrogenase (DHODH), enzyme mitochondriale qui catalyse la conversion médiée par l'ubiquinone du dihydroorotate (DHO) en orotate et fournit des électrons à la chaîne de transport des électrons via l'ubiquinone ; DHODH relie la bioénergétique mitochondriale à la synthèse *de novo* des pyrimidines<sup>280</sup>. L'utilisation de l'inhibiteur pharmacologique BAY2402234 qui cible DHODH (actuellement en développement clinique) révèle une forte dépendance des cellules de gliomes *IDH1m* à l'activité DHODH et la possibilité d'une hypersensibilisation des gliomes *IDH1m* aux dommages de l'ADN<sup>279</sup>. De façon intéressante, l'inhibition de l'activité de la DHODH induit une différenciation partielle des cellules de LAM dans des modèles murins et des lignées cellulaires humaines<sup>281,282</sup> et présente donc aussi une activité anti-leucémique. Ces observations soulignent l'importance des défauts de réparation des dommages de l'ADN dans les tumeurs *IDHm*.

#### 1.4.1.4. Adaptation à l'hypoxie

L'adaptation hypoxique est médiée par la famille des régulateurs transcriptionnels hypoxia inductible factor (HIF, HIF-1 $\alpha$ , -2 $\alpha$  et -3 $\alpha$ ) qui agissent sous forme d'hétérodimères  $\alpha/\beta$  (la sous-unité  $\beta$  est aussi appelée aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT) et qui induisent un ensemble de gènes spécifiques<sup>283,284</sup>. En normoxie, les sous-unités HIF $\alpha$  sont hydroxylées par les enzymes prolyl hydroxylase (PHD, aussi appelées EGLN)

dépendantes de l' $\alpha$ KG, avant leur dégradation par le protéasome (la ligase E3 codée par le gène suppresseur de tumeur *von-Hippel Lindau* (*VHL*) participe à cette signalisation). En condition hypoxique, la diminution de l'activité PHD et de la dégradation protéasomale de HIF $\alpha$  permet l'activité des complexes HIF $\alpha/\beta$ . Cette situation peut être mimée en condition normoxique, par des niveaux réduits d' $\alpha$ KG ou de Fe $^{2+}$ , par l'accumulation de L-2HG ou de D-2HG et par l'accumulation des métabolites du cycle de Krebs fumarate ou succinate (qui se comportent comme des inhibiteurs compétitifs vis-à-vis de l' $\alpha$ KG à l'instar du D-2HG<sup>217</sup>). Ces conditions favorisent l'activité des complexes HIF et induisent un état pseudohypoxique<sup>285</sup> (**Figure 18**). Des résultats contradictoires ont été rapportés concernant la réalité de l'effet inhibiteur des énantiomères du D-2HG sur l'activité des complexes HIF : dans une étude, le D-2HG produit par la mutation *IDH* active *EGLN1*<sup>286</sup> tandis que dans une autre étude, les échantillons présentant une mutation *IDH* présentent un profil transcriptomique significatif d'un état pseudo-hypoxique<sup>287</sup>. Une étude a proposé que les deux énantiomères soient oxydés en  $\alpha$ KG de manière non enzymatique par une chimie de type Fenton médiée par le fer et d'autres agents réducteurs tels que l'ascorbate et le glutathion réduit (GSH)<sup>288</sup>. La réaction de Fenton est une réaction d'oxydation qui consiste en la décomposition du H $_2$ O $_2$  par des sels métalliques (Fe $^{2+}$  ou Fe $^{3+}$ ) pour générer des espèces radicalaires (notamment le radical hydroxyle), réaction décrite comme utilisable pour l'oxydation des acides  $\alpha$ -hydroxylés<sup>289</sup>. L'oxydation du D-2HG est permise par le H $_2$ O $_2$  pour produire de l' $\alpha$ KG, du succinate semi-aldéhyde et du succinate en présence de Fe $^{2+}$  ou Fe $^{3+}$ <sup>288</sup>. L'adaptation hypoxique est particulièrement importante pour les tumeurs solides. Il a aussi été montré que les complexes HIF inhibent la prolifération des CSH et des cellules leucémiques dans certains modèles humains primaires ou cellulaires (U937T) et murins (rats, souris) de LAM<sup>290</sup>.



**Figure 18** : Les métabolites du cycle de Krebs régulent l'activité des complexes transcriptionnels HIF

En normoxie, HIF- $\alpha$  est hydroxylée par des PHD et ciblée pour une dégradation dans le protéasome par le complexe VHL. Dans des conditions hypoxiques, l'activité des PHD est inhibée, empêchant l'hydroxylation de HIF- $\alpha$ , ce qui entraîne sa stabilisation. HIF- $\alpha$  est transloqué dans le noyau où il s'associe à HIF-1 $\beta$  pour activer la transcription des gènes cibles impliqués dans le métabolisme, l'angiogénèse, l'érythropoïèse, les réponses immunitaires et l'invasion tumorale<sup>172</sup>. La combinaison d'une hypoxie et d'une production de ROS mitochondriaux diminue l'activité PHD et augmente l'activité des sous-unités HIF-1 $\alpha$ <sup>291</sup>. En normoxie, les ROS libérés par les mitochondries et les niveaux accumulés de métabolites succinate, fumarate et L-2-HG peuvent inhiber l'activité des PHD provoquant un état de pseudo-hypoxie. L'augmentation des niveaux intracellulaires d' $\alpha$ KG dans les cellules cancéreuses hypoxiques provoque une déficience métabolique sévère qui conduit à la mort cellulaire<sup>292</sup>. Issue de Martinez-Reyes *et al.*, Nat Commun, 2020.

#### 1.4.1.5. Maturation des collagènes

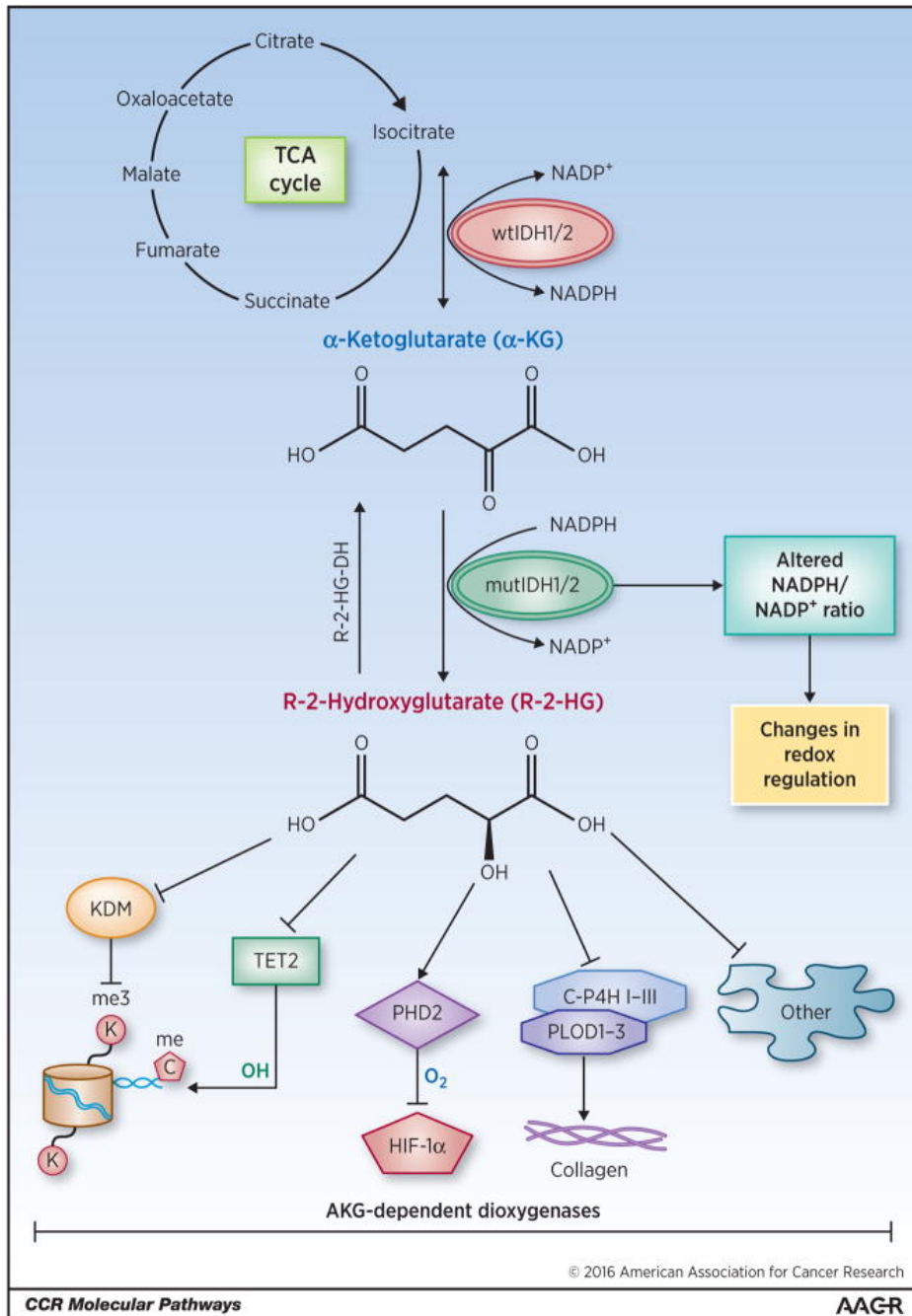
Les enzymes collagen prolyl-4-hydroxylase (C-P4H) et procollagen-lysine 2-oxoglutarate 5-dioxygénase (Plod) hydroxylent les résidus prolines et lysines des protéines du collagène et sont dépendantes de l' $\alpha$ KG. L'accumulation de résidus hydroxyproline et hydroxylysine dans une protéine de collagène mature renforcent sa structure hélicoïdale et favorisent sa stabilité thermique<sup>293</sup>. En inhibant les enzymes C-P4H et Plod, le D-2HG diminue l'accumulation de formes collagène immatures au profit des formes matures<sup>294</sup>. Le collagène de type IV est un des composants principaux des membranes basales<sup>295</sup>. L'incapacité des cellules à synthétiser ce composé mature en présence de D-2HG entraîne

la dégradation des membranes basales et modifie les capacités migratoires des cellules *IDHm*<sup>294</sup>. Les dioxygénases C-P4H et Plod sont localisées dans le réticulum endoplasmique (RE), leur inhibition entraîne l'accumulation de protéines de collagènes nouvellement synthétisées non repliées dans le RE<sup>296,297</sup>, ce qui déclenche une réponse de stress du RE qui peut conduire à l'apoptose<sup>298</sup>.

#### 1.4.1.6. *Épissage de l'ARN*

Outre leur association fréquente avec les mutations *SRSF2*, les mutations *IDH* induisent intrinsèquement des défauts d'épissage<sup>158,299</sup>. Les bases moléculaires de cette observation ne sont pas entièrement établies. Une hypothèse possible est que la méthylation aberrante de l'ADN induite par les mutations *IDH* altère la reconnaissance des introns lors de la transcription des gènes. En effet, l'assemblage du spliceosome se produit de manière co-transcriptionnelle, ce qui indique que la structure de l'ADN influence l'épissage alternatif. Il a été montré que le facteur de transcription CTCF favorise l'inclusion d'exons en induisant une pause de l'ARN polymérase II<sup>300</sup>. Une forte rétention d'introns a été montrée dans les cellules de LAM<sup>301</sup>.

Ces exemples montrent que le D-2HG inhibe un grand nombre d'enzymes dépendantes de l' $\alpha$ KG mais la part respective de ces inhibitions fonctionnelles dans la leucémogénèse reste à déterminer (**Figure 19**).



**Figure 19** : Conséquences des mutations *IDH*

Issue de Clark *et al.*, Clin Cancer Res, 2017.

### 1.4.2. Altérations métaboliques liées aux mutations *IDH*

Le métabolisme mitochondrial est dérégulé dans les cellules *IDHm*, entraînant des vulnérabilités métaboliques spécifiques des tumeurs *IDHm*. Ces sensibilités ne sont pas identiques entre modèles *IDH1m* et modèles *IDH2m*. Par exemple, alors que certaines études *in vitro* ont montré une diminution des niveaux de GSH et une augmentation des

niveaux de ROS dans les cellules exprimant des mutations *IDH1*, les mutations *IDH2* ne semblent pas modifier le potentiel redox dans les cellules hématopoïétiques des modèles murins<sup>302</sup>.

Le D-2HG perturbe la synthèse de coenzyme NAD, de façon indirecte, par l'inhibition de l'expression du gène codant pour l'enzyme nicotinate phosphoribosyltransférase (NAPRT1) qui intervient dans la synthèse de ce coenzyme. Ce processus rend les cellules *IDH1m* vulnérables à une inhibition ciblée de la nicotinamide phosphoribosyltransférase (NAMPT), elle est aussi associée à la synthèse du NAD dans une voie parallèle et qui peut être ciblée par des inhibiteurs pharmacologiques. La déplétion en NAD active AMPK, déclenche l'autophagie et entraîne une cytotoxicité<sup>303</sup>.

Il a été montré chez la levure que l'accumulation de D-2HG inhibe de façon directe l'activité de la sous-unité  $\beta$  de l'ATP synthase mitochondriale (ATP5B), aussi appelée complexe V et cette inhibition se répercute sur l'activité de mTOR (qui est un senseur de l'ATP) et par la suite sur la croissance cellulaire qui dépend de mTOR<sup>304</sup>. Cette observation est particulièrement importante car elle lie les activités *IDHm* et D-2HG avec celles de mTOR et de la croissance cellulaire. Elle a également été validée dans des modèles cellulaires *IDHm*. Surtout, cette observation indique que de façon contre-intuitive, l'oncométabolite présente une activité anti-proliférative.

L'oncométabolite produit par *IDH1m* dans les cellules de gliomes est aussi responsable d'une hypersuccinylation dans la mitochondrie (réaction dans laquelle le succinyl-CoA dérivé du métabolisme modifie les groupes lysine des protéines) par l'inhibition de l'activité SDH (qui est active dans le cycle de Krebs) et par l'accumulation de succinyl-CoA. Cette dérégulation métabolique induit de manière préférentielle l'hypersuccinylation des protéines mitochondriales entraînant une dépolarisation mitochondriale et une inhibition partielle de la respiration mitochondriale. Cet effet augmente le métabolisme tumoral car il induit une accumulation de BCL-2 au niveau de la membrane mitochondriale, entraînant une augmentation de la résistance à l'apoptose<sup>305</sup>.

Le D-2HG inhibe l'activité de la cytochrome c oxydase (COX) de la chaîne de transport des électrons mitochondriale. L'inhibition de l'activité COX augmente l'activation des complexes pro-apoptotiques BAX/BAK, c'est pourquoi la suppression de cette activité abaisse le seuil mitochondrial déclenchant l'apoptose en cas d'inhibition de BCL-2<sup>306</sup>. Cette observation est à mettre en regard avec la sensibilité singulière des LAM *IDHm* au venetoclax<sup>307,308</sup>.



Enfin, l'anabolisme lipidique est plus élevé dans les lignées cellulaires exprimant une mutation *IDH1*<sup>309</sup>, le métabolisme des acides gras semblant influencer sur la résistance aux thérapies ciblées *in vitro*<sup>309,310</sup>.

### **1.4.3. Thérapies des LAM avec mutations *IDH***

#### *1.4.3.1. Traitements conventionnels*

##### 1.4.3.1.1. Chimiothérapie intensive

La chimiothérapie représente le traitement le plus largement utilisé pour les patients atteints de LAM, l'association cytarabine-anthracycline étant la norme de soins. De nombreuses études ont évalué l'impact des mutations *IDH* sur la réponse au traitement intensif et la survie des patients atteints de LAM, avec des résultats controversés<sup>311,312</sup>. Ces différences sont susceptibles d'être influencées entre autres, par le type de mutation ainsi que par la présence de mutations concomitantes, notamment *DNMT3A*. Des études précliniques ont démontré que les mutations *DNMT3A* confèrent une résistance aux anthracyclines par le biais d'une altération du remodelage des nucléosomes<sup>313</sup>. Il a aussi été fait état d'une amélioration des résultats en terme de survie, avec une induction et une consolidation par anthracycline à dose croissante dans la LAM avec anomalies *DNMT3A*, *NPM1* ou *FLT3*, toutes fréquentes chez les patients atteints de LAM avec mutation *IDH*. Ces observations suggèrent que des doses plus élevées d'anthracyclines peuvent être envisagées chez les patients atteints de LAM avec mutation *IDH* et présentant ces mutations associées<sup>15,314-316</sup>.

##### 1.4.3.1.2. Agents hypométhylants

L'azacitidine et la décitabine sont devenues la norme de soins pour un grand nombre de ces patients<sup>317</sup>. L'impact des mutations *IDH* sur les réponses aux agents hypométhylants reste néanmoins mal défini<sup>258,265</sup>. Dans une étude portant sur des patients atteints de LAM traités par décitabine ou azacitidine, les taux de réponse étaient significativement plus élevés chez les patients présentant des mutations *IDH*<sup>143</sup>. En revanche, deux autres études rétrospectives évaluant 68 et 175 patients atteints de LAM traités par une thérapie à base d'agents hypométhylants n'ont pas identifié de différences significatives dans les taux de réponse ou la survie globale en fonction de la présence de mutations *IDH*<sup>312,318</sup>. Malgré

une signature de méthylation très semblable entre anomalies *TET2* et *IDH* dans les cellules de LAM, des différences de réponse sont observées, probablement liées aux effets indépendants de l'inhibition de *TET2* associés à l'accumulation de D-2HG<sup>319</sup>.

#### 1.4.3.2. Thérapies ciblées

L'effet pathogène des mutations *IDH* est lié à son activité enzymatique néomorphique, c'est pourquoi de petites molécules inhibitrices de type allostérique ont été développées. L'inhibition des formes mutantes *IDH* par ces agents, normalise le taux de D-2HG, inverse progressivement le phénotype d'hyperméthylation observé dans les cellules de LAM vers une hypométhylation des cellules<sup>266</sup>, et induit une différenciation cellulaire à la fois *in vitro*<sup>320</sup> et *in vivo*<sup>321</sup>.

L'enasidenib (ou AG-221) est un inhibiteur spécifique des mutations *IDH2*. Dans l'étude de phase I/II qui a conduit à son approbation, un total de 239 patients atteints de LAM, dont 176 (74%) R/R (rechute ou réfractaire), ont été recrutés<sup>322</sup>. Le taux de réponse global, (y compris CR (complete response), CR avec récupération hématologique incomplète (CRh), CR avec récupération plaquettaire incomplète, rémission partielle ou état morphologique sans leucémie) pour tous les patients était de 40,3%. Le taux de CR était de 19,3%, avec un délai médian avant la première réponse de 1,9 mois et une durée médiane de réponse de 5,8 mois. La durée médiane de survie chez les patients a été de 9,3 mois et la survie a augmenté de façon notable à 19,7 mois chez les patients ayant obtenu une CR. Les études translationnelles adossées à ces essais, ont montré que les mutations de *NRAS* et d'autres gènes codant pour des effecteurs des voies mitogen-activated protein kinases (MAPK) sont enrichies chez les patients qui ne répondent pas et peuvent contribuer à la résistance primaire à l'AG-221<sup>323</sup>. L'association de l'AG-221 et de l'azacitidine semble être efficace dans une étude de phase Ib/II sur des patients atteints de LAM avec une mutation *IDH2* nouvellement diagnostiquée, avec un taux de réponse globale de 74 %, supérieure à l'azacitidine seule<sup>324</sup>.

L'ivosidenib (ou AG-120) est un inhibiteur spécifique des mutations *IDH1*. Un essai de phase I a été mené sur 258 patients atteints de LAM R/R présentant une mutation *IDH1*. Le taux de réponse global était de 41,6 %, et le taux de CR était de 21,6 %. La durée de vie du groupe ayant obtenu une CR était de 9,3 mois. Parmi les patients ayant obtenu une CR ou CRh, 21% ont eu une réponse moléculaire profonde avec des mutations *IDH1* indétectables<sup>325</sup>. Là encore, des mutations dans des gènes codant pour des récepteurs à

activité tyrosine kinase (RTK, tels que les gènes *KIT* et *FLT3*) ou leurs effecteurs (NRAS, KRAS, tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11, PTPN11, aussi connue sous le nom de SHP2) sont associées à des résistances primaires au traitement AG-120<sup>326-328</sup>. La combinaison entre AG-120 et l'azacitidine chez des patients atteints de LAM avec mutation *IDH1* n'ayant jamais été traités, a permis d'obtenir une réponse globale de 78 %<sup>329</sup>. Plus récemment, une synergie entre l'azacytidine et l'AG-120 dans l'éradication de rares CSL quiescentes et responsables de résistance à l'AG-120 utilisé seul, a été montrée dans un modèle murin de LAM *IDH1m*<sup>330</sup>.

La molécule IDH305, un autre inhibiteur d'IDH1, a montré une activité anti-leucémique intéressante dans un essai clinique de phase I<sup>331</sup>.

L'inhibiteur d'IDH1 de deuxième génération le plus prometteur est l'olutasidenib (FT-2102). En monothérapie, lors d'un essai clinique de phase II, le FT-2102 a permis l'obtention d'un taux de réponse globale de 46 % chez des patients atteints de LAM R/R. La présence d'autres mutations (*NPM1*, *DNMT3A*, *ASXL1* et dans des gènes codant pour des RTK et leurs effecteurs) est là encore corrélée à une diminution du taux de réponse globale et de CR<sup>332</sup>. En association avec l'azacitidine, le FT-2102 a induit une CR durable chez un sous-ensemble de patients atteints de LAM avec mutation *IDH1*<sup>333</sup>.

Le vorasidenib (AG-881), un inhibiteur double des mutations *IDH1* et *IDH2*, est en cours d'évaluation dans le traitement des gliomes<sup>334</sup>.

Les thérapies ciblées enasidenib et ivosidenib entraînent des résistances secondaires, comme la majorité des thérapies ciblées utilisées dans les hémopathies à ce jour (ciblant les activités BCR-ABL, ALK, BTK ou EGFR pour exemples). Chez les patients ayant acquis une résistance à l'enasidenib ou l'ivosidenib, on observe la sélection ou l'évolution de clones, pouvant être minoritaires au diagnostic, qui acquièrent des anomalies dont certaines sont récurrentes (i.e. délétion chr 7q, FLT3ITD/TKD...)<sup>335</sup>. Parmi ces anomalies, l'acquisition d'une mutation dans le gène *IDH* (*IDH1* ou *IDH2*) initialement non muté au diagnostic est retrouvée chez un nombre significatif de patients<sup>335,336</sup>. On observe également des mutations *IDH* secondaires sur un nouveau site (Q316E, I319M pour *IDH2* et S280F pour *IDH1*) qui perturbent la liaison des inhibiteurs et ré-entraînent une production élevée de D-2HG qui survient après 6 à 9 mois de traitement<sup>337,338</sup>. Les mutations de facteurs de transcription liés à la différenciation hématopoïétique, tels que *RUNX1*, *CEBPA* et *GATA binding protein 2* (*GATA2*), sont associées aux phénomènes de résistance aux inhibiteurs IDH<sup>328,339,335</sup>. L'hyperméthylation de promoteurs de gènes exprimés dans les cellules

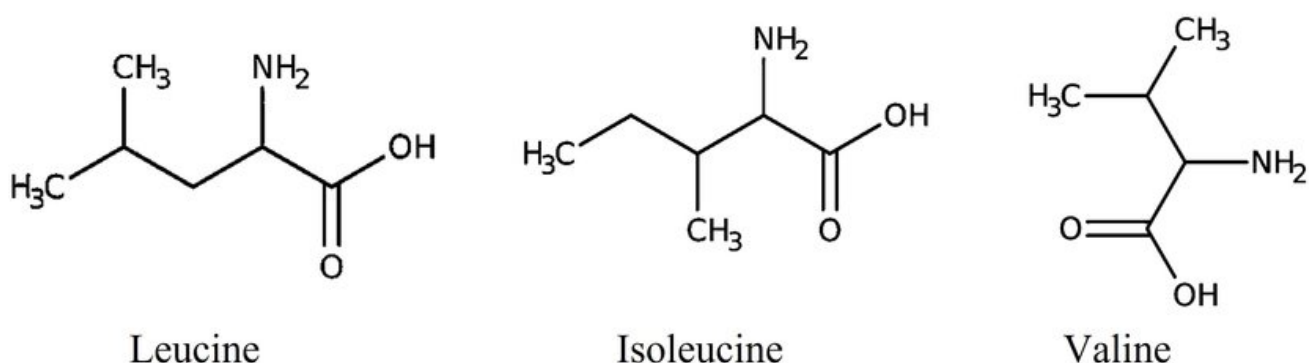
souches (*Forkhead Box C1 (FOXC1)*, *CD99* et *DNMT3A*) semble également associée à la résistance aux inhibiteurs IDH<sup>340</sup>.

Une reprogrammation métabolique mitochondriale (OXPHOS et oxydation des acides gras) a été mise en évidence dans les cellules de LAM *IDHm*. Cette augmentation de l'activité oxydative mitochondriale a été associée aux résistances secondaires à l'AG-221 et l'AG-120<sup>310</sup>.

## 1.5. MÉTABOLISME DES ACIDES AMINÉS BRANCHÉS

Le métabolisme des AA branchés (BCAA) est une voie métabolique essentielle. Les taux circulants de BCAA (et les taux de leurs produits cataboliques, les  $\alpha$ -cétoacides à chaîne ramifiée (BCKA) qui sont aussi des indicateurs) ont tendance à augmenter chez les personnes obèses et sont associés à une mauvaise santé métabolique et à une future résistance à l'insuline ou au diabète de type 2<sup>341</sup>. Le dysfonctionnement catabolique des BCAA est également liée à la maladie dite « du sirop d'érable », aux cardiopathies congénitales et à l'insuffisance cardiaque<sup>342</sup>.

Les BCAA regroupent la leucine, l'isoleucine et la valine et sont composés d'une chaîne latérale aliphatique avec une branche (un atome de carbone central lié à trois atomes de carbone ou plus) (**Figure 20**). Ce sont des AA essentiels, non synthétisés par l'organisme, issus du catabolisme des protéines de l'alimentation ou de la dégradation des réserves de protéines tissulaires<sup>343,344</sup>.



**Figure 20** : Structure des acides aminés branchés

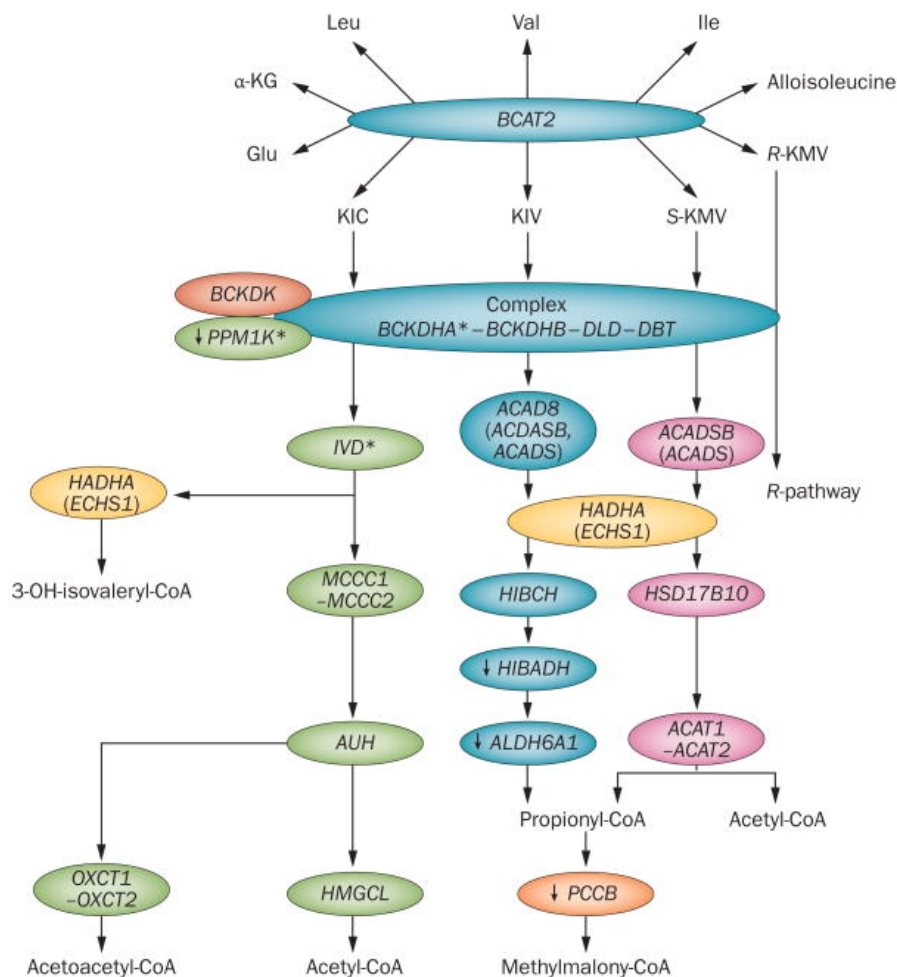
Issue de Kim *et al.*, Poultry Science, 2022.

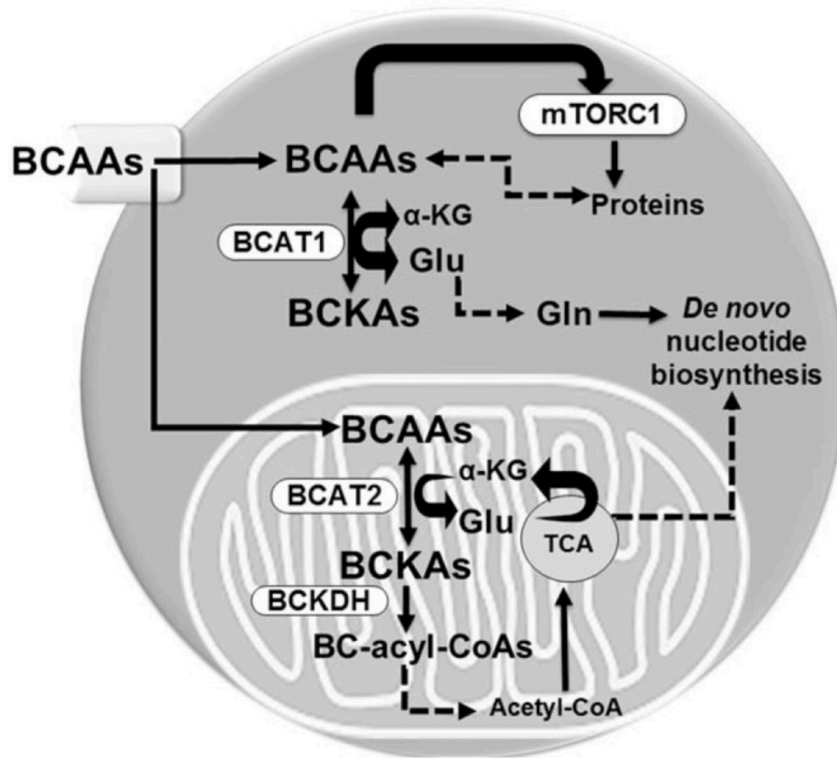
Les BCAA sont importés dans la cellule par les transporteurs d'AA de type L (ou L-type amino acid transporter, LAT) et notamment LAT1 qui est un système de bi-transport exportant simultanément la glutamine<sup>345</sup>. Le transporteur SLC25A44 est responsable du transport des BCAA dans les mitochondries<sup>346</sup>.

Le catabolisme des BCAA consiste en une première étape de transamination catalysée par les enzymes branched-chain aminotransferase (BCAT) qui aboutit à la formation de céto-acides branchés (ou branched-chain keto acid, BCKA). L'acide alpha-cétoisocaproïque (ou  $\alpha$ -ketoisocaproate,  $\alpha$ -KIC), l'acide alpha-cétoisovalérate (ou  $\alpha$ -ketoisovalerate,  $\alpha$ -KIV) et l'acide alpha-cétométhylvalérate (ou  $\alpha$ -keto- $\beta$ -methylvalerate,  $\alpha$ -KMV) sont respectivement issus de la transamination de la leucine, de l'isoleucine et de la valine. Ces réactions transfèrent le groupe amine des BCAA à l' $\alpha$ KG pour produire du glutamate, les enzymes BCAT1 (cytosolique) et BCAT2 (mitochondriales) sont des transaminases dépendantes de l' $\alpha$ KG. La réaction de transamination catalysée par les enzymes BCAT est réversible, ce qui permet la production de BCAA par ré-amination des BCKA pouvant provenir d'autres tissus<sup>347</sup>. Les deux isoformes BCAT1 et BCAT2 sont codées par deux gènes. BCAT2 est présente de manière ubiquitaire alors que BCAT1 est exprimée de façon préférentielle dans certains tissus, notamment les cellules neurales<sup>348</sup>. L'expression du gène *BCAT1* est pour partie dépendante des facteurs de transcription kruppel like factor 15 (KLF15) et PPAR $\delta$ <sup>349</sup>. L'étape limitant la vitesse du catabolisme et l'élimination des BCAA est la décarboxylation irréversible des BCKA par le complexe  $\alpha$ -cétoacide déshydrogénase à chaîne ramifiée (ou branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase complex, BCKDH ; aussi appelé BCKDC parfois appelé BCKDHC) (**Figure 21A**). Le complexe BCKDH se trouve sur la membrane interne de la mitochondrie et est composé de E1 $\alpha$  (aussi connu sous le nom de BCKDHA), E1 $\beta$  (BCKDHB), E2 (DLT) et E3 (DLP). L'activité de la BCKDH est inhibée par la phosphorylation de la sous-unité E1 $\alpha$  par la kinase BCKDK, kinase qui émerge comme une kinase essentielle des processus métaboliques et tumoraux<sup>350</sup>, cette phosphorylation inhibe l'activité de BCKDH et bloque le catabolisme des BCAA. À l'inverse, la déphosphorylation de BCKDH par la Ser/Thr phosphatase mitochondriale PP2Cm (codée par le gène *PPMIK*) stimule l'activité du complexe BCKDH. La réponse coordonnée entre BCKDK et PP2Cm permet d'obtenir une activité optimale du complexe BCKDH, afin de maintenir l'homéostasie des BCAA (aussi régulée par les niveaux de BCKDA et d' $\alpha$ KIC<sup>351,352</sup>). Les produits finaux de l'oxydation complète des BCAA varient en fonction de l'AA, seules l'isoleucine et la valine sont capables de fournir des précurseurs de carbone pouvant être utilisés pour la synthèse du glucose, ou de toute autre molécule dérivée d'un précurseur autre que l'acétyl-CoA.

Le catabolisme des BCAA satisfait plusieurs exigences des cellules tumorales (**Figure 21B**). Premièrement, la dégradation des BCAA fournit des résidus carbones pour la synthèse d'autres molécules et qui permet d'alimenter le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative pour fournir de l'énergie aux cellules. Deuxièmement, la dégradation des BCAA fournit de l'azote pour la synthèse *de novo* des nucléotides et des AA. Troisièmement, le métabolisme des BCAA modifie les niveaux de cofacteurs qui influencent l'épigénome (acétyl-CoA). Enfin, ces AA peuvent affecter la synthèse des protéines, soit en agissant directement comme acides aminés protéinogènes, soit en signalant l'état nutritionnel des cellules<sup>353</sup>.

**A**



**B****Figure 21** : Métabolisme des BCAA

**A)** Gènes mitochondriaux participant à la voie BCAA. Abréviations : Leu, Leucine ; Val, Valine ; Ile, Isoleucine ;  $\alpha$ -KG,  $\alpha$ -cétoglutarate ; Glu, glutamate ; KIC,  $\alpha$ -cétoisocaproate ; KIV,  $\alpha$ -cétisovalerate ; KMV,  $\alpha$ -cétob-méthylvalerate. Issu de Lynch et *al.*, Nat Rev Endocrinol, 2014. **B)** Un modèle du métabolisme des BCAA dans le cancer. Abréviations : BCAAs, branched-chain amino acids ; BCKAs, branched-chain ketoacids ; BCKDH,  $\alpha$ -KG,  $\alpha$ -cétoglutarate ; Glu, glutamate ; Gln, glutamine. Issu de Ananieva *et al.*, Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2018.

La leucine fait partie des AA les plus abondants dans les protéines.

L'activité de BCAT1 est essentielle à l'auto-renouvellement et la pluripotence des cellules souches embryonnaires chez la souris, et cet effet est médié par la voie de signalisation Ras et des modifications d'expression génique dont les relais moléculaires ne sont pas connus<sup>354</sup>.

L'inhibition de la voie BCAA est une approche thérapeutique dans les cancers en général. Les BCAA jouent un rôle dans la régulation du cycle cellulaire par le biais de l'activation de mTORC1, activation qui implique la glycoprotéine CD98, codée par le gène *SLC3A2*<sup>44,355</sup>. CD98 est impliquée dans le transport des acides aminés et joue un rôle dans la mécanotransduction par son interaction avec les intégrines. Cette protéine est souvent surexprimée dans les cellules cancéreuses qui ont des besoins nutritionnels accrus. Elle est essentielle à la survie et à la prolifération d'un certain nombre de lignées cellulaires de LAM

humaines<sup>356,357</sup>. Par ses multiples fonctions, CD98 participe à l'homéostasie des CSL<sup>358</sup>. CD98 régule également l'absorption du glucose, et par conséquent la voie des pentoses phosphates (PPP), ce qui soutient aussi la prolifération cellulaire<sup>355</sup>. CD98 est nécessaire à la localisation membranaire de LAT1 (codé par le gène *SLC7A5*) et lui sert de chaperon. Les transporteurs multifonctionnels LAT et plus particulièrement LAT1, fournissent aux cellules cancéreuses les AA essentiels, substrats des réactions biosynthétiques et bioénergétiques et stimulent les signalisations intracellulaires impliquées dans la survie, la croissance et la prolifération. De façon intéressante, dans les gliomes avec mutation *IDH1*, le complexe LAT1-CD98, est significativement surexprimé et pourrait être un marqueur des cellules souches tumorales<sup>359</sup>. LAT1 est également impliqué dans l'activité des macrophages infiltrant les gliomes (macrophages qui participent à la progression et l'invasion tumorale), créant la possibilité d'une stratégie thérapeutique visant à restaurer un microenvironnement tumoral plus sensible aux thérapies<sup>360</sup>. Une inhibition de l'activité de LAT1 est envisagée notamment dans les glioblastomes<sup>361</sup>. C'est pourquoi, de petites molécules inhibant l'activité du transporteur ont été développées, comme l'analogue de la leucine, acide 2-aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylique (BCH). Le BCH inhibe l'importation de leucine via les transporteurs LAT et ralentit significativement la croissance et la prolifération de différentes lignées cellulaires LAM (HL60, NB4, K562). Dans cet exemple, on observe une réduction de la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 ribosomal protein (S6RP), substrat de mTOR<sup>362</sup>. Un ralentissement de la croissance tumorale a été rapportée avec l'utilisation d'un autre inhibiteur de LAT1, appelé KYT-0353<sup>363</sup>. Par ailleurs, l'invalidation génétique ou pharmacologique de LAT1 dans différentes lignées cellulaires cancéreuses entraîne une suppression complète du transport de la leucine, conduisant à une activation de la voie de la kinase GCN2 (aussi appelée eIF2AK4), à l'inhibition de mTORC1 et à la suppression de la croissance tumorale<sup>364</sup>. JPH203, un autre inhibiteur pharmacologique de LAT1 en cours d'évaluation clinique, inhibe drastiquement le transport des AA, la signalisation mTORC1 et le processus de traduction dans les cellules d'adénocarcinome canalaire<sup>365</sup>.

BCAT1 est une isoforme souvent impliquée dans la croissance tumorale<sup>353</sup>, et des niveaux élevés de *BCAT1* sont observés dans divers types de cancers. L'isoforme BCAT2 mitochondriale semble moins associée aux processus néoplasiques à l'exception de l'adénocarcinome ductal du pancréas<sup>366</sup>.

Dans le cancer du sein, l'expression élevée de *BCAT1* est corrélée à des taux augmentés de BCAA dans le plasma et les tissus et s'accompagne d'une production d'ATP et d'une



diminution des ROS ; la surexpression de *BCAT1* en activant mTOR, facilite la croissance et la formation de colonies *ex-vivo*<sup>367</sup>. La surexpression de *BCAT1* joue également un rôle pathogène dans le carcinome hépatocellulaire en soutenant la prolifération cellulaire et la chimiorésistance, l'expression de *BCAT1* ayant une forte signification pronostic pour la survie de ces patients<sup>368</sup>. De façon intéressante, dans les carcinomes hépatocellulaires, l'accumulation de BCAA s'observe dans les hépatocytes tumoraux mais pas dans le sérum des patients. Ces BCAA sont spécifiquement détournés du catabolisme en raison de changements dans l'expression des enzymes cataboliques de la voie, notamment les enzymes du complexe BCKDHA. Cet exemple montre que la voie BCAA s'adapte aux besoins nutritionnels des cellules tumorales et au métabolisme unique de chaque type cellulaire<sup>369</sup>. L'expression élevée de *BCAT1* dans le glioblastome multiforme est également corrélée à une issue plus défavorable pour les patients<sup>370</sup>. Dans les tumeurs épithéliales de l'ovaire, *BCAT1* est fortement surexprimé et associé à la progression dans le cycle cellulaire, la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire. De manière surprenante, dans ce tissu, la suppression de *BCAT1* affecte le métabolisme et est associée à une diminution de l'expression des gènes *IDH1* et *IDH2*<sup>371</sup>.

### **1.5.1. BCAT1 et hématopoïèse normale ou pathologique**

La fonction des BCAA dans l'hématopoïèse normale est peu décrite. La valine est critique pour la prolifération et la survie des CSH. Une carence en valine bloque la prolifération des CSH humaines et murines *in vitro* et un régime pauvre en valine diminue drastiquement la fréquence des CSH chez l'animal<sup>372</sup>. Une déficience d'activité de PPM1K prolonge la survie des cellules de LAM dans un modèle murin, indiquant que cette voie participe à la survie des cellules leucémiques<sup>373</sup>.

*BCAT1* est l'isoforme prédominante des macrophages humains et est associée à leurs réponses inflammatoires<sup>374</sup>. Dans ces cellules, *BCAT1* affecte l'activité du cycle de Krebs de façon indirecte par l'activation du facteur nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (NRF2)<sup>375</sup>. Le gène *BCAT1* pourrait être un gène cible des complexes PCR2/EZH2<sup>376,377</sup>.

L'activité de *BCAT1* est associée à l'homéostasie des CSL<sup>378,377</sup>, par le contrôle qu'exerce l'enzyme sur le taux d' $\alpha$ KG intracellulaire (dans ces cellules, la voie des BCAA est essentiellement catabolique)<sup>379</sup>. L'expression de *BCAT1* est également induite lors de l'acutisation des leucémies myéloïdes chroniques (LMC) en LAM, signe de l'importance de la voie en contexte d'hyper-prolifération<sup>380</sup>. L'expression soutenue de *BCAT1* dans les cellules leucémiques pourrait induire un phénotype « BCRAness » liée à l'inhibition

fonctionnelle de dioxygénases impliquées dans les processus de réparation à l'ADN<sup>381</sup>. Il a été proposé que BCAT1 confère une protection contre les ROS aux cellules de LAM<sup>382</sup>.

### **1.5.2. BCAT1 et cellules neurales**

La région promotrice de BCAT1 présente des sites de liaison de plusieurs régulateurs transcriptionnels, notamment c-Myc<sup>383,384</sup>, HIF<sup>385</sup> et SMAD5<sup>386</sup>. L'hypoxie augmente les niveaux d'ARNm et de protéine du transporteur LAT1 et de BCAT1, mais pas leurs paralogues LAT2-4 et BCAT2, dans des lignées cellulaires et cellules primaires de glioblastome (GBM). L'inhibition génétique ou pharmacologique de *BCAT1* inhibe la croissance des cellules de GBM sous hypoxie<sup>385</sup>.

Dans les GBM, l'excès de BCKA est excrété par les cellules tumorales, et l'inhibition de leur transporteur monocarboxylic acid transporter 1 (MCT1) entrave la croissance tumorale<sup>387</sup>. BCAT1 est associé à la prolifération et la croissance des GBM<sup>388</sup>. Son expression est également corrélée aux processus d'apoptose, d'hypoxie et d'angiogenèse dans les gliomes et une expression élevée de *BCAT1* révèle un niveau de glycolyse plus élevé<sup>389</sup>. Une sensibilité au stress oxydatif et la dépendance à la glutamine semble être liée à l'activité BCAT dans les gliomes avec mutation *IDH*<sup>390</sup>. Dans les GBM, une fonction inattendue de BCAT1 a été montrée, liée au contrôle qu'exerce l'enzyme sur la ségrégation des chromosomes lors de la mitose, et témoignant du rôle de BCAT1 dans la prolifération des cellules cancéreuses<sup>391</sup>.

---

## **2. Objectifs des travaux de thèse**

---

Les modifications métaboliques liées à la présence des mutations *IDH* dans la LAM restent largement inexplorées. De ce fait, la découverte de nouvelles voies métaboliques dérégulées est un enjeu majeur de ce projet.

Notre hypothèse de travail initiale était qu'il existe une reprogrammation métabolique particulière des cellules LAM mutées pour un gène *IDH*, du fait de la modification de la quantité d' $\alpha$ KG que cette mutation impose. Compte tenu de la difficulté à étudier l'ensemble des réactions enzymatiques dépendant de ce co-substrat, nous nous sommes intéressés en particulier à la voie des BCAA.

Pour approcher de manière non biaisée l'étude de cette voie, nous avons d'abord étudié le flux de production de l'acide aminé leucine et de son dérivé, l'acide alpha-cétoisocaproïque, par des approches de marquage métabolique, ce qui nous a permis de mettre en évidence un sens anabolique inattendu de la voie dans les cellules leucémiques porteuses d'une anomalie *IDH2*. Par des analyses transcriptomiques, nous avons identifié des modifications d'expression du gène *BCAT1* et de ses différents transcrits, et avons identifié les modalités de régulation de ce gène dans des cellules primaires de LAM *IDH2m*. Nous avons mis en évidence dans des cellules primaires de patient, dans des modèles cellulaires et un modèle PDX, le contrôle qu'exerce l'activité BCAT1 sur la prolifération cellulaire dans le contexte *IDH2m*. Nous avons poursuivi l'étude de cette voie, par l'exploration du statut d'activation des effecteurs de la voie mTORC1, dont il est connu qu'elle est activée par la leucine. Nous avons aussi mis en évidence que l'inhibition fonctionnelle de BCAT1 dans les cellules primaires LAM *IDH2m* engage une inhibition de l'activité de MYC et une différenciation partielle de ces cellules.

En nous reposant sur une analyse de la littérature, nous nous sommes intéressés au facteur de transcription CEBPA, en tant que relai de l'axe de signalisation BCAT1/mTORC1. Nous avons mis en évidence que l'abondance relative des isoformes p42 et p30 de CEBPa est un des éléments capables d'expliquer la différenciation myéloïde que l'inhibition de BCAT1 entraîne. Nous cherchons aujourd'hui les déterminants moléculaires conditionnant l'abondance des isoformes p42 et p30 en contexte *IDH2m*, comparativement au contexte *IDHwt*.

L'ensemble de nos résultats suggèrent une sensibilité particulière des cellules LAM *IDH2m* à l'inhibition de l'activité de BCAT1, pouvant constituer une nouvelle cible thérapeutique.

---

# 3. Résultats

---

## **Branched-chain amino acid metabolic pathway reprogramming in mutant IDH2 human acute myeloid leukemias**

Amaury Bongers<sup>1,14</sup>, Maël Heiblig<sup>1,14\*</sup>, Laure Delestre<sup>1,14</sup>, Nicolas Poulain<sup>1</sup>, Clément Potoizeau<sup>2</sup>, Florence Castelli<sup>3</sup>, Christophe Junot<sup>3</sup>, Yuna Blum<sup>4</sup>, Sylvie Job<sup>5</sup>, Sebastian Gregoricchio<sup>1</sup>, Alexandra Galois<sup>1</sup>, Filippo Rosselli<sup>6</sup>, Muriel M David<sup>1</sup>, Sylvain Garciaz<sup>7</sup>, Estelle Duprez<sup>7,13</sup>, Lucille Stuani<sup>8</sup>, Jean-Emmanuel Sarry<sup>8,13</sup>, Takahiro Ito<sup>9</sup>, Lynn Quek<sup>10</sup>, Katherine Yen<sup>11</sup>, Oliver A Bernard<sup>1</sup>, Stéphane De Botton<sup>1,12,13</sup>, Chris Ottolenghi<sup>2,15</sup> and Virginie Penard-Lacronique<sup>1,13,15</sup>

<sup>1</sup> UMR U1170 INSERM, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Equipe Labellisée Ligue Nationale Contre le Cancer, Villejuif, France.

<sup>2</sup> Biochimie métabolomique et protéomique, Département de Biologie, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France

<sup>3</sup> Drug Metabolism Research Laboratory, Frédéric Joliot Institute for life science, CEA, Saclay, France

<sup>4</sup> UMR 6290 CNRS, Institute Genetics and Development, Rennes, France

<sup>5</sup> UMR-S 1193, Hôpital Paul Brousse, Université Paris-Saclay, Villejuif, France

<sup>6</sup> UMR 9019 CNRS, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Equipe Labellisée Ligue Nationale Contre le Cancer, Villejuif, France

<sup>7</sup> Cancer Research Center of Marseille, Institut Paoli Calmettes, Aix-Marseille Université, Marseille, France

<sup>8</sup> UMR 1037 INSERM, Cancer Research Center of Toulouse, Equipe Labellisée Ligue Nationale Contre le Cancer, LabEx Toucan, Toulouse, France

<sup>9</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Franklin College of Arts and Sciences, The University of Georgia, Athens, Georgia, USA

<sup>10</sup> Myeloid Leukaemia Genomics and Biology Group, School of Cancer and Pharmaceutical Sciences, King's College London, London, UK

<sup>11</sup> Auron Therapeutics, Wellesley Hills, MA, USA

<sup>12</sup> Hematology Department, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Villejuif, France

<sup>13</sup> a member of OPALE Carnot Institute, *The Organization for Partnerships in Leukemia*, France

<sup>14</sup> These authors contributed equally: Amaury Bongers, Maël Heiblig, Laure Delestre

<sup>15</sup> These authors jointly supervised this work: Chris Ottolenghi and Virginie Penard-

Lacronique ; e-mail: [chris.ottolenghi@parisdescartes.fr](mailto:chris.ottolenghi@parisdescartes.fr); [virginie.penard-](mailto:virginie.penard-<br/>lacronique@inserm.fr)

[lacronique@inserm.fr](mailto:virginie.penard-<br/>lacronique@inserm.fr)

\* present address:

## HIGHLIGHTS

- Primary mutant *IDH2* AML cells demonstrate leucine anabolism
- Inhibiting BCAT1 activity strongly affects *IDH2*<sup>R140</sup> AML growth
- BCAT1/mTORC1 signaling participates in myeloid differentiation through CEBPA

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was partly supported by grants from INSERM. C.O and V.P-L acknowledge funding from Fondation ARC, Fondation Gustave Roussy and Eliorgroup, and Fédération nationale des Groupements des Entreprises Françaises dans la Lutte contre le Cancer (GEFLUC). M.H. was a fellow of the Philanthropia Fondation. This work was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale, grant number (FDT202106013029), to AB. This work has benefited from the facilities and expertise of the Imaging and Cytometry Platform (Yann Lecluse, Philippe Rameau), UMS AMMICA (US 23 INSERM/UMS 3655 CNRS), Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France. The authors also thank Translational Research Laboratory (Cyril Quivoron), Département d'Hématologie (Christophe Willekens), Service de Pharmacologie (Julia Delahousse, Angelo Paci), Département de Biologie et Pathologie Médicales (Véronique Saada), Genomic platform (Nahalie Droin), Preclinical Research platform for experimental pathology (Olivia Bawa, Paule Opolon) and technical assistance with NSG mice (Christophe Metereau, Melanie Polrot and Patrick Gonin), all from Gustave Roussy Cancer Campus.

## SUMMARY

Somatic mutations in isocitrate dehydrogenase (IDH) enzymes arise in 20% of acute myeloid leukemia (AML). They result in neomorphic enzymatic function and production of an oncometabolite, 2-hydroxyglutarate (D2-HG) that causes metabolic and epigenetic changes contributing to hematopoietic cell transformation. Little is known about the metabolic wiring in *IDH* mutant primary human AML, as it is unknown whether *IDH* mutations select pathways that provide compensatory changes to support D2-HG-driven metabolic defects. We identified an unanticipated metabolic shift toward production of leucine, a branched-chain amino acid (BCAA), in mutant *IDH2* leukemic blasts while leucine catabolism hallmarks their wild-type counterparts. Leucine anabolism was associated to an upregulation of the  $\alpha$ -KG-dependent *branched-chain amino acid transaminase 1* (*BCAT1*) gene by breaking a H3K27me3-dependent negative regulatory mechanism due to *IDH2* mutation. This situation strikingly opposes to leucine consumption and loss of *BCAT1* expression observed in mutant *IDH1* glioma, revealing tissue-specific metabolic requirements in mutated *IDH* cancers. Knockdown of *BCAT1* expression or activity strongly affected mutant *IDH2* AML cells growth in culture and in a xenografted model and resulted in partial cellular differentiation marked by the acquisition of granulocytic markers. In line, we identified a functional connection between *BCAT1*, mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) and translation of the CCAAT enhancer binding protein alpha (CEBP $\alpha$ ) transcription factor, a master regulator of granulopoiesis that participates in the proliferation-differentiation switch in myeloid progenitor/precursor cells. These findings reveal a metabolic feature of mutant *IDH2* AML that regulate cellular proliferation and impact differentiation by running the BCAA pathway in reverse and point to a metabolic vulnerability that comes with an increased reliance to dietary leucine.



## INTRODUCTION

The metabolic nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP<sup>+</sup>)-dependent enzymes isocitrate dehydrogenase (IDH) participate in the tricarboxylic acid (TCA) cycle, a central pathway in the metabolism of sugars, lipids and amino acids (AA). Both cytoplasmic and peroxisomal (IDH1) and mitochondrial (IDH2) isoforms reversibly catalyze the decarboxylation of isocitrate to yield  $\alpha$ -ketoglutarate ( $\alpha$ -KG), NADPH, and CO<sub>2</sub>. On the other hand, mutations in *IDH1* or 2 in solid and hematologic malignancies result in excess production of the oncometabolite (D)-2-hydroxyglutarate (D2-HG) via NADPH-mediated reduction of  $\alpha$ -KG<sup>1 2 3</sup>. D2-HG has immunosuppressive effects and affects the functions of tumor-associated cells<sup>4 5</sup>. At the cellular level, D2-HG behaves as a competitive inhibitor of  $\alpha$ -KG and antagonize  $\alpha$ -KG-dependent dioxygenases including TET family of 5-methylcytosine hydroxylases<sup>6</sup>, Jumonji-domain histone demethylases (JHDM) family<sup>7 8 9</sup> and the N6-methyladenosine (m6A) RNA demethylase FTO<sup>10 11</sup>, and induces widespread chromatin alterations and deregulated RNA methylation and splicing<sup>12 13</sup>. Thus accumulation of D2-HG alters the expression of a very wide range of genes involved in self-renewal and cellular differentiation<sup>9 14 15</sup> and DNA repair<sup>16 17</sup>, leading to undifferentiated phenotype and BRCAness phenotype<sup>18 19</sup>. D2-HG also affects mitochondrial functions<sup>20, 21 22 23</sup> and rewires metabolic pathways, leading to a vulnerability of mutant *IDH* cells to BCL2 inhibition<sup>22 21</sup> and oxidative stress<sup>24 25</sup>, addiction to metabolites<sup>26 27</sup>, and decrease in proliferation/viability<sup>27 20 11</sup>, a situation that can be exploited therapeutically<sup>28 29</sup>. Interestingly, combination therapies with inhibitors of mutant IDH2 (enasidenib)<sup>30</sup> or IDH1 (ivosidenib)<sup>31</sup> with BCL-2 activity inhibition (venetoclax) demonstrated superior anti-leukemic activity in comparison to single agents in the treatment of mutant *IDH* AML<sup>32 33 34</sup>.

We hypothesized that D2-HG accumulation and concomitant  $\alpha$ -KG depletion in mutant *IDH* AML cells could affect the activity of  $\alpha$ -KG-dependent transaminase enzymes implied in amino acid metabolism and identified an unexpected synthesis of leucine, an essential amino acid (AA) belonging to the branched-chain amino acids (BCAA) group, that characterizes primary human mutant *IDH* AML cells. BCAA degradation is predominant in cancers, including AML, and end products of BCAA oxidation fuel the tricarboxylic acid (TCA) cycle and oxidative phosphorylation (OXPHOS) to provide energy. In myeloid leukemia, BCAA breakdown through the activity of the  $\alpha$ -KG-dependent BCAT1 transaminase, contributes to

disease progression<sup>35</sup> and maintenance of leukemic stem cells<sup>36 37</sup>. We show here that primary AML blasts expressing an oncogenic form of *IDH2*, i.e., *IDH2<sup>R140Q</sup>*, or treated with the cell-permeant D2-HG, switched from leucine consumption to leucine accumulation, leading to a depletion into the keto-analog of leucine,  $\alpha$ -ketoisocaproate ( $\alpha$ KIC). Leucine synthesis is beneficial to primary *IDH2<sup>R140</sup>* leukemic cells by promoting signaling networks linked to cellular proliferation, and by sustaining a partially deficient mTORC1 activity. Therefore, BCAT1 genetic or pharmacological inhibition strongly counteracted leukemia expansion in a *IDH2<sup>R140Q</sup>* AML patient-derived xenograft (PDX) model whereas it was less relevant to wild-type *IDH2* (*IDH2<sup>WT</sup>*) AML phenotype. Inhibition of BCAT1 also induced a partial granulocytic differentiation in *IDH2<sup>R140Q</sup>* AML cells, due to modification in the translation of functional distinct forms of the CEBP $\alpha$  transcription factor, i.e., the full-length p42 and truncated p30 isoforms, acting to prime myeloid progenitors for proliferation and differentiation along the granulocyte-macrophage lineage, and which we identified as critical downstream effectors of the BCAT1/mTORC1 axis in malignant myeloid progenitors.

## RESULTS

### Leucine anabolism is favored in primary mutant *IDH* AML cells

BCAA breakdown involves a first reversible transamination step performed by BCAT who transfer the BCAA amino group to  $\alpha$ KG to produce a branched chain  $\alpha$ -ketoacid (BCKA) and glutamate. BCKAs can be converted back to BCAAs for protein synthesis and  $\alpha$ KG production, while in contrast, BCAA remaining catabolic steps initiated by the branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase (BCKDH) complex, are unidirectional. To track the fate of leucine and  $\alpha$ KIC in mutant (*IDH2*<sup>R140</sup>) and wild-type (*IDH2*<sup>WT</sup>) *IDH2* AML bulks, primary SSC<sup>low</sup>CD45<sup>int</sup> blasts were purified by FACS, and BCAA- and BCKA-tracing experiments were performed with [<sup>13</sup>C]-labeled leucine or [<sup>13</sup>C]- $\alpha$ KIC respectively (Fig. 1A). Samples were collected after 1 hour of tracing and metabolite measurement was performed by gas chromatography (GC)-MS. BCAA oxidation flux using [<sup>13</sup>C]leucine established a significant labeling of  $\alpha$ KIC in *IDH2*<sup>WT</sup> blasts, indicating a contribution of transamination to BCAA in those cells ([<sup>13</sup>C]- $\alpha$ KIC conversion to leucine: *IDH2*<sup>R140</sup> = 39.13  $\pm$  6.313; *IDH2*<sup>WT</sup> = 3.967  $\pm$  1.686; *p*=0.0058). In contrast, a clear enrichment of labeled leucine was observed in *IDH2*<sup>R140</sup> samples, showing the formation of leucine from  $\alpha$ KIC but not the breakdown of leucine to  $\alpha$ KIC. Stable isotope tracer experiments performed in the hematopoietic human PLB-985 cell line (a derivative of the HL-60 cell line) engineered to express either human *IDH2*<sup>R140</sup> or the wild-type allele confirmed a BCAA oxidation in the latter context, at 30min after labeling (data not shown). In contrast, [<sup>13</sup>C]- $\alpha$ KIC formation was barely detectable in *IDH2*<sup>R140</sup> cells, while again an efficient production of leucine from  $\alpha$ KIC was observed. Therefore, AML with *IDH2* mutation show decreased levels of  $\alpha$ KIC compared to control cells, a situation reminiscent of AML cell lines expressing a mutant form of *IDH1* (data not shown).

As D2-HG accumulated at high levels in *IDH2*<sup>R140</sup> AML, we sought to examine the effects on leucine anabolism of treatment of *IDH2*<sup>WT</sup> AML with the cell-permeable octyl ester of D2-HG (octyl-2HG). We used *IDH2*<sup>WT</sup>-expressing PLB-985 cells and [<sup>13</sup>C]leucine and [<sup>13</sup>C]- $\alpha$ KIC tracers to interrogate dynamic leucine metabolism upon incubation with increasing doses of octyl-2-HG (0-300  $\mu$ M). Treatment with 200 or 300  $\mu$ M octyl-2-HG achieved  $\sim$ 10 and 15 $\mu$ M D2-HG intracellular levels, which are not as high as that observed in primary AML but avoid a too pronounced apoptotic effect (data not shown). Tracing experiments evidenced an enforced switch from leucine catabolism to anabolism by exogenous D2-HG (data not shown),

indicating that D2-HG lies at the root of the metabolic rewiring. To further model steady-state BCAA network dynamics, we tested if D2-HG may inhibit BCAT activity. We treated *IDH2*<sup>WT</sup> PLB-985 cells with octyl-2HG (0-100-200-300  $\mu$ M) in culture media supplemented or not with  $\alpha$ KG and performed leucine tracing by using [<sup>13</sup>C]- $\alpha$ KIC (data not shown). We observed that M+3 leucine levels proportionally augmented upon octyl-2HG exposure only when cells were cultured in media not supplemented with  $\alpha$ KG. This indicates that D2-HG effectively limits BCAT activities that are dependent of  $\alpha$ KG and that BCAT inhibition affects only one direction.

We confirmed an abnormal stoichiometric regulation of leucine metabolism *in vivo*, by measuring the concentration of  $\alpha$ KIC by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) on a collection of sera obtained from patients with newly diagnosed/treatment-naive *IDH2*<sup>R140</sup> (N=21) or *IDH2*<sup>WT</sup> AML (N=10) (Fig. 1C).  $\alpha$ KIC concentration was  $\leq 10$   $\mu$ mol/L in most of our samples and had a linear correlation with D2-HG (data not shown), while in *IDH1*<sup>WT</sup> or *IDH2*<sup>WT</sup> AML individuals,  $\alpha$ KIC concentration was in the normal reference range and showed minimal variation. Although the abundance of circulating  $\alpha$ KIC fluctuates based on food intake and despite the existence of individual variation, this observation strengthens the hypothesis that in AML, the *IDH* lesion stimulates leucine synthesis by  $\alpha$ KIC transamination. Similarly, a partial inactivation of BCAT1 by D2-HG has been reported in *IDH1*<sup>R132</sup> glioma in which leucine breakdown is preponderant, that limits the supply of glutamate and creates a vulnerability to treatment with glutaminase inhibitors<sup>24</sup>. The reasons why D2-HG-driven BCAT1 modulation meets the needs of glioma growing remains precisely unclear, i.e., to limit the use of  $\alpha$ KG or to antagonize leucine consumption. However, in AML, leucine anabolism may satisfy specific requirement.

### **Epigenetic marks regulate *BCAT1* expression in mutant *IDH2* AML cells**

To determine whether modulation of the BCAA metabolic pathway rely on altered BCAT expression and/or epigenetic changes due to D2-HG accumulation, we analyzed BCAT expression profile in primary mutant *IDH* AML. No significant change in mitochondrial BCAT2 expression was found by quantitative RT-PCR (qRT-PCR) between FACS-purified mutant or wild-type *IDH2* AML blasts, while accumulation of transcripts from the cytosolic BCAT1 was predominant in mutant *IDH2* cells (Fig. 2A). Significant difference in mean level of *BCAT1*

gene transcripts was confirmed in a large data set of primary AML *IDHm* samples, i.e., the Beat AML dataset<sup>38</sup> (Fig. 2B), while expression of *BCAT2* or other transaminases did not significantly differ between genotypes (Extended Data, Fig. 2E). Western blot analysis confirmed that *BCAT1* protein expression was high in primary *IDH2* AML blasts while low or nearly absent in wild-type *IDH2* controls (Fig. 2C), suggesting that despite the genetic heterogeneity of human blasts, *IDH2<sup>R140</sup>* mutation governs the accumulation of *BCAT1*. Alternative transcripts differing in their first exons have been reported in the human *BCAT1* gene, that originate from two alternative promoters, P1 and P2, that both co-localize with CpG-enriched regions known as CpG islands (CGI) (Fig. 2D). Whether expression of these transcripts is translated into functional differences in the gene product is yet unknown. We characterized *BCAT1* transcripts expression by qRT-PCR and observed the predominant expression of 201 transcripts initiated at P1 in primary AML, while expression of 204 initiated at P2 was reduced, although higher in *IDH2<sup>R140</sup>* compared with *IDH2<sup>WT</sup>* cells (Fig. 2E). A significant dose-response relationship also emerged between increasing expression of all *BCAT1* transcripts and increase of octyl-2HG used to treat *IDH<sup>WT</sup>* PLB-985 (Fig. 2F) and K562 cells (Extended Data, Fig. 2A) showing that accumulation of D2-HG elicits a similar *BCAT1* transcriptional induction as the *IDH2* genetic lesion. In keeping, octyl-2HG treatment increased the accumulation of *BCAT1* protein in K562 cells (Extended Data, Fig.2b).

By exploiting the TCGA database<sup>39</sup>, we observed that while P1 methylation pattern tended to be relatively stable in the two genetic groups, P2 exhibited a significantly higher level of DNA methylation in *IDH2<sup>R140</sup>* AML blasts (Fig. 2D), a situation reminiscent of what was reported in *IDH1<sup>R132</sup>* gliomas<sup>40</sup> and that indicates a methylation-sensitive variation in promoter usage. Semi-quantitative HELP (HpaII tiny fragment Enrichment by Ligation-mediated PCR) assays<sup>41</sup> performed on DNA isolated from sorted primary *IDH2<sup>R140</sup>* and *IDH2<sup>WT</sup>* AML confirmed the presence of hypermethylated cytosine residues in the former (Fig. 2D). Recent work has proposed a negative regulation of murine *Bcat1* expression in leukemic cells through the activity of enhancer of zeste homolog-2 (EZH2), the enzymatic subunit of the Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) that catalyzes Histone 3 Lysine 27 (H3K27) methylation<sup>37</sup>. We thus investigated by chromatin immunoprecipitation coupled with quantitative PCR (ChIP-qPCR) the H3K27me3 pattern at P1 and P2 regions in FACS-sorted primary *IDH2<sup>R140Q</sup>* and *IDH2<sup>WT</sup>* blasts and observed a significant accumulation of the

methylation (average enrichment of ~18-fold at P1 and ~7-fold at P2) at and around annotated transcription start sites (TSSs) in *IDH2<sup>WT</sup>*, as compared with the *peptidylprolyl isomerase A* (*PPIA*) negative target. In contrast, the same regions showed a significant decrease in H3K27me3 abundance in *IDH2<sup>R140Q</sup>* cells, while levels of H3K4me3 and H3K27Ac associated with active transcription, were not statistically different on TSS regions between the two genotypes (Fig. 2G). H3K27me3 is deposited at promoters by the preferential association of EZH2-PRC2 with CpG-rich DNA elements and high level of DNA methylation at CGI may impair EZH2 recruitment and participate to transcripts de-repression<sup>42</sup>. Consistent with this idea, mutant *IDH2* may promote *BCAT1* transcription and the persistent use of hypermethylated P2, as illustrated by the induction of 204 transcripts (Fig. 2E). Furthermore, overexpression of *BCAT1* in *IDH2<sup>R140Q</sup>* AML may illustrate regional preferences and/or differential deposition of H3K27m3, as already reported in mutant *IDH* tumor cells<sup>43</sup>, in parallel with the overall increase in H3K27me3 methylation that reflects D2-HG-mediated inhibition of  $\alpha$ -KG-dependent histone demethylases (data not shown). Evidence is mounting for a developmental and epigenetic regulation of *BCAT1* in hematopoiesis. Epigenetic mechanisms control access to regulatory regions in the murine *Bcat1* locus both in AML model and during physiological myeloid differentiation<sup>37</sup> as in human solid tumors<sup>44</sup>. We also evidenced the transcriptomic profile of *BCAT1* as a feature of stem/progenitor cells in the human hematopoietic tree (Extended Data, Fig. 2C), as in AML blasts and leukemic stem cells (LSC) where its activity contributes to  $\alpha$ KG metabolism<sup>36</sup>. Further, we confirmed the negative prognostic impact of high levels (above median expression value) of *BCAT1* in the Beat AML dataset<sup>38</sup> (Extended Data, Fig. 2D), as observed on smaller cohorts<sup>35 36</sup>.

### **Mutant *IDH2* AML cells are dependent on *BCAT1* activity for their growth**

We next dissected the effects of *BCAT1* loss during AML evolution in a patient-derived xenograft (PDX) model, and employed retroviral expression of a functionally validated short hairpin RNA *BCAT1* (sh*BCAT1*) construct<sup>35</sup> to mediate depletion of *BCAT1* (Fig. 3A). We confirmed a 60% reduction in accumulation of all *BCAT1* transcripts relative to a non-targeting negative control shRNA (shCtrl) and subsequent decrease of the corresponding protein (Extended Data, Fig. 3A and 3B). Retroviral sh*BAT1* and shCtrl constructs were introduced into *IDH2<sup>R140Q</sup>* (Patient #7; dominant clone with *IDH2<sup>R140Q</sup>-NPM1*

co-mutations) or *IDH2*<sup>WT</sup> (Patient #1, dominant clone with *NPM1* co-mutations) AML bulk populations and transduced populations were transplanted by intra-femoral injection into immunocompromised (NOD scid gamma, NGS) mice (Fig. 3A). Donor bone marrow (BM) chimerism monitored over 3 months after transplantation showed a time-dependent increase in transduced AML cells (positive for human CD45 [hCD45] and GFP, CD45<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>) confirming engraftment in each recipient (Extended Data, Fig. 3C). In endpoint studies, we found a marked expansion of both the shCtrl- and shBCAT1-transduced *IDH2*<sup>WT</sup> AML cells moving into peripheral blood (PB), demonstrating that *BCAT1* did not significantly alter the development of the patient-derived xenografts in comparison with *IDH2*<sup>WT</sup>-shCtrl engrafted mice (Fig. 3B). In contrast, the *IDH2*<sup>R140Q</sup>-shBCAT1 AML transplanted cohort showed delayed AML expansion, pointing out to a strong disadvantage for the combination of *IDH2*<sup>R140Q</sup> and shBCAT1, compared with the *IDH2*<sup>R140Q</sup>-shCtrl control arm. In mice that received *IDH2*<sup>R140Q</sup>-shBCAT1 cells, a significantly reduced CD45<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> cell frequency was observed when BM tissues were analyzed, indicating that BCAT1 function was required for *IDH2*<sup>R140Q</sup> AML cells maintenance and/or expansion, while less relevant to the proliferation of *IDH2*<sup>WT</sup> AML cells (Fig. 3C and 3D). We could demonstrate in *IDH2*<sup>R140Q</sup>-shBCAT1 AML transplanted mice that *BCAT1* inhibition was also associated to a decreased viability of blast cells in BM (Extended Data, Fig. 3D). Remarkably, we observed that *BCAT1* depletion also promoted a partial granulo-monocytic differentiation of *IDH2*<sup>R140Q</sup> blasts, as staining for human CD15 (Fig. 3E) and CD14 (Fig. 3F) differentiation markers which increased specifically in the course of normal granulocytic and monocytic differentiation respectively, showed a significant increase in the mean fluorescence intensity (MFI) in all the positive BM fractions from *IDH2*<sup>R140Q</sup>-shBCAT1 AML transplanted mice, compared with the *IDH2*<sup>R140Q</sup>-shCtrl cohort. Collectively and consistent with *BCAT1* activation in other models of human leukemia<sup>35 36</sup>, *BCAT1* inhibition selectively reduces the growth of primary *IDH2*<sup>R140Q</sup> AML cells and offers a dual mode of action of proliferation inhibition and differentiation induction, that points to BCAT1's crucial role in dictating AML cells fate.

We next interrogated the function of BCAT1 in the viability and proliferation of *IDH2*<sup>R140Q</sup>-expressing PLB-985 cells cultured *in vitro* and, as an alternative approach to gene knockdown, we employed a specific inhibitor of BCAT1, i.e., BCATc Inhibitor 2, and the synthetic amino acid gabapentin (GABA), a structural analog of leucine<sup>45</sup>, which previously

showed anti-leukemic activity in BCR-ABL-associated chronic myeloid leukemia progression<sup>35</sup>. *IDH2*<sup>R140Q</sup>-PLB-985 cells demonstrated a sensitivity to GABA and BCATi with IC<sub>50</sub> (concentration where 50% viability is observed) of ~25 mM and ~50 μM respectively and showed a significant decrease in survival in their presence compared with *IDH2*<sup>WT</sup>-PLB-985 isogenic cells (Extended Data, Fig. 3E). At similar concentrations, both compounds similarly affected the viability of primary *IDH2*<sup>R140Q</sup> blasts and a dose-dependent linearity was observed (Extended Data, Fig. 3F).

### **BCAT1-driven signaling is involved in various processes in *IDH2*<sup>R140Q</sup> AML cells**

To identify the transcriptional pathways and mechanisms that contribute to proliferation arrest and partial myeloid differentiation in response to *BCAT1* inhibition, we performed transcriptome-wide RNA-sequencing analysis in *IDH2*<sup>R140Q</sup> (N=3) and *IDH2*<sup>WT</sup> (N=3) leukemic blasts upon lentiviral *BCAT1* knockdown. For external validation, we collected publically available data from GSE100784, gathering human hematopoietic *IDH*<sup>WT</sup> cell lines invalidated for *BCAT1* expression<sup>36</sup>. Gene correlation analysis was done using data in the Gene Expression Omnibus (GEO), Molecular Signatures Database (MSigDB), KEGG pathway enrichment and TCGA databases. Global gene set enrichment analysis (GSEA) showed a significant down regulation of genes enriched in MYC and E2F targets, mitotic spindle and G2M checkpoint signatures defined by MSigDB in *IDH2*<sup>R140Q</sup> cells (Fig. 3G and Extended Data, Fig. 3I), pointing out the contribution of BCAT1-induced pathways to cell growth and division, both of which are essential for cell proliferation, and consistent with the contribution of BCAT1 to tumor growth demonstrated in our PDX model. *BCAT1* invalidation further caused a significant inhibition of OXPHOS, ribosome biogenesis and translation, and concomitant activation of inflammatory pathways and notably the classical interferon alpha (IFN $\alpha$ )- and IFN $\gamma$ -stimulated genes, suggesting BCAT1-driven signaling as involved in widespread cellular metabolism and processes (Extended Data, Fig. 3H, J). GSEA also demonstrated a significant decrease in double-strand break repair mechanism associated to homologous recombination (HR), a DNA repair defect known to be associated to the expression of *IDH* mutation<sup>16 18 17</sup>, but with a yet unexplained interconnectivity with BCAT1 signaling. In a sharp contrast, BCAT1 knockdown in *IDH2*<sup>WT</sup> blasts produced the opposite effect, activating signaling related to cell proliferation, cell cycle and OXPHOS while inhibiting inflammatory responses (Fig. 3G).



Enrichment of these signatures was confirmed in the GSE100784 dataset investigating the role of BCAT1 in human *IDH2*<sup>WT</sup> AML cell lines, identifying thus BCAT1 as a broad regulator of malignant myeloid stem/progenitor cells homeostasis regardless of *IDH* mutation.

MYC participates in metabolic reprogramming in cancer cells (reviewed in <sup>46</sup>) and a previous study reported that a MYC/SLC7A5/SLC43A1 circuit coordinates elevated essential AA uptake, including leucine, and mTORC1 activation <sup>47</sup>. Interestingly, most mutant *IDH* AML also upregulated MYC to counteract the counterintuitive antiproliferative effects of D2-HG <sup>20 11</sup>. GSEA showed that MYC-activated gene sets were negatively enriched in *IDH2*<sup>R140Q</sup> blasts whereas positively enriched in *IDH2*<sup>WT</sup> cells upon *BCAT1* depletion (Fig. 3G), revealing BCAT1 signaling as a major driving force for MYC activity in AML cells, a situation that has been previously observed in lung cancer models <sup>48</sup>. In keeping, increased MYC function was recently associated to loss of *TET2* in AML, independent of MYC abundance <sup>49</sup>. Additionally, *BCAT1* that is also known as *ECA39*, was designed as a target gene for c-MYC <sup>50</sup>, highlighting the interdependence of the two activities.

### **BCAT1 functions correlate with mTORC1 activities in *IDH2*<sup>R140Q</sup> AML cells**

Interestingly, a number of above pathways emerge as effectors of the mechanistic target of rapamycin (mTOR) Complex 1 (mTORC1), which coordinates multiple aspects of cell biology with nutrients, growth factors and cellular energy status <sup>51</sup>, notably cell growth, ribosome biogenesis, translation, as G2/M checkpoint <sup>52</sup> and replication stress response <sup>53</sup>. Importantly, leucine stimulates mTORC1 activity <sup>54 55 56</sup> and BCAT1 positively regulates mTORC1 <sup>57 35 58</sup>, while excess of D2-HG decreases mTORC1 signaling, likely due to the moderation of ATP synthesis by the  $\alpha$ -KG-dependent ATP synthase <sup>20</sup>, a process that affects mTOR functions <sup>59</sup>. Moreover, MYC and mTOR are tightly connected nodes, as MYC sustains the functions of mTOR and conversely, mTOR controls the translation of MYC. Due to the importance of mTORC1 in AML physiopathology (reviewed in <sup>60, 61</sup>), we asked whether BCAT1-mediated leucine anabolism would sustain the mTORC1 activity otherwise inhibited by accumulation of D2-HG in *IDH2*<sup>R140Q</sup> AML. Consistently, we observed that phosphorylation levels of the mTORC1 substrates p70 ribosomal protein S6 kinase 1 (S6K1) and eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1 (4E-BP1) were reduced in primary *IDH2*<sup>R140Q</sup> AML compared with *IDH2*<sup>WT</sup> blasts, while phosphorylation level of AKT, a substrate of the

mTOR Complex 2 (mTORC2), was increased in *IDH2*<sup>R140Q</sup> AML cells compared with *IDH2*<sup>WT</sup> (Fig. 4A and 4B). Using inhibitors of mTOR, i.e. the rapamycin, the dual inhibitor of mTORC1/2 PP242<sup>62</sup> and the dual pan-PI3K/mTOR inhibitor Omipalisib/GSK2126458 (referred as GSK458), we confirmed a substantial sensitivity of primary *IDH2*<sup>R140Q</sup> AML blasts to PP242 and GSK458, that were significantly more effective than rapamycin in eliciting anti-leukemic effects *in vitro*, with a 3- or 4-fold decrease in cell survival in primary *IDH2*<sup>R140Q</sup> blasts relative to their *IDH2*<sup>WT</sup> counterparts at a dose of 1 μM or 0.1 μM of PP242 or GSK458 respectively (Fig. 4C). As one of the main functions of mTORC1 is to regulate cell growth, we also interrogated the association between growth and mutant *IDH2*-induced accumulation of D2-HG (Fig. 4E). PLB-985 or K562 cells expressing *IDH2*<sup>R140Q</sup> were treated with increasing doses of enasidenib inhibitor that reverse the effects of mutant *IDH2*<sup>63</sup>, showing that D2-HG intracellular concentrations linearly correlated with cell population doubling times. A similar relationship was observed in primary *IDH2*<sup>WT</sup> AML treated with increasing doses of octyl(R)-2HG (data not shown) emphasizing the notion that, consistent with previous studies<sup>20 11</sup>, D2-HG intrinsically affects AML cells growth rate. Finally, when primary *IDH2*<sup>R140Q</sup> AML cells were maintained in culture in the presence of all amino acids minus leucine, addition of leucine was sufficient to restore normal growth rates, as observed in nonstarved cells (Fig. 4D). Addition of leucine similarly increased cell population doubling times of the two cell lines *IDH2*<sup>R140Q</sup>- and *IDH2*<sup>R172K</sup>-PLB-985, while not of the *IDH2*<sup>WT</sup>-PLB-985 isogenic cells (Fig. 4D). Collectively, these findings argue for a dependency to nutrient conditions and mTORC1 activity for *IDH2*<sup>R140Q</sup> AML, as proposed for mutant *IDH1* glioma<sup>20</sup>.

### **mTOR inhibition extends the survival of *IDH2*<sup>R140</sup> AML mice**

To determine the importance of mTORC1 in *IDH2*<sup>R140Q</sup> AML growth *in vivo*, we established an aggressive PDX model using *IDH2*<sup>WT</sup> and *IDH2*<sup>R140Q</sup> blasts serially transplanted into NSG mice (N=10 mice per AML sample; patients #1 and #10, Supplemental Table 1) and used GSK458, demonstrating broad antitumor activity in preclinical and clinical studies<sup>64</sup>. Intra-femoral injection of these cells, which also express luciferase for tracking, results in an AML that disseminates within hematopoietic organs and kills the recipients in a few weeks. When hCD45-positive cells became detectable (≥2% of blasts in peripheral blood), animals were randomly allocated to vehicle (N=5) or GSK458 (N=5) at 30 mg/kg once daily until end of

treatment (Day 21). Without treatment, AML cells rapidly expanded, leading to a lethal disease in control animals (vehicle) with a median survival of 16 and 21 days for *IDH2<sup>WT</sup>* and *IDH2<sup>R140Q</sup>* blasts respectively (Extended Data, Fig. 4A). While GSK458 treatment did not confer survival advantage to mice transplanted with *IDH2<sup>WT</sup>* AML cells, the cohort transplanted with cells derived from *IDH2<sup>R140Q</sup>* survived until study termination, showing a significant increase in the median life span (Extended Data, Fig. 4A). The survival advantage in the *IDH2<sup>R140Q</sup>* AML group was accompanied with a reduction in blasts viability, assessed by a decrease in hCD45-positive cells in BM aspirates from GSK458-treated *IDH2<sup>R140Q</sup>* AML recipients obtained at day 15 of treatment compared with controls and enhanced apoptosis rates (data not shown); however *in vivo* imaging system (IVIS) did not evidence statistically significant decrease in tumor burden nor tumor infiltration to organs in the *IDH2<sup>R140Q</sup>* AML group compared with the control group during time course (Extended Data, Fig. 4C). At day 21, all animals from the GSK458-treated *IDH2<sup>R140Q</sup>* AML group were alive, a time at which we decided to stop the follow-up to explore the potential curative effect of GSK458. Hematoxylin-eosin-safranin (HES) staining evidenced massive intramedullar cell death and necrosis in GSK458-treated animals, although not significantly different between the two genotypes (Extended Data, Fig. 4B), due to the strong toxicity of GSK458 *in vivo* induced by blocking multiple mechanisms of signaling circuits.

### **CEBPA relays the BCAT1/mTORC1 axis in myeloid progenitor differentiation**

Given that leucine/BCAT1 regulates mTORC1 and that mTORC1/S6K1/MYC signaling exerts a critical control on the differentiation of granulocyte-monocyte progenitors (GMP)<sup>65 66</sup>, we next studied whether BCAT1 may directly modulate myeloid differentiation. In addition, as mTOR controls the translation of the lineage instructing pioneering transcription factor CEBPA through the translation initiation factors eIF-4E<sup>67</sup>, we tested whether mTORC1 activity may be relayed by CEBPA. This factor coordinates cell fate and cell differentiation in various cell types, including in myeloid cells. CEBPA is seemingly active in AML *IDHm* cells (cell lines and PDX)<sup>68,14</sup>, although the molecular basis of this activation is unknown.

To model CEBPA-related myeloid differentiation we used the 1,25-dihydroxyvitamin D(3) (calcitriol)-induced monocytic differentiation. Calcitriol-triggered differentiation has been reported in an *IDH1m* AML established cell line, that seemingly involves CEBPA<sup>68</sup>. We first

confirmed that calcitriol engaged the differentiation of native PLB-985 cells as assessed by the increased expression of CD11b and CD14 markers, concomitant with the decrease in CD13 and CD33 staining (Extended Data, Fig. 5C-D). Calcitriol exposure affects population doubling of native PLB985 cell-line (Extended Data, Fig. 5A) and has a limited impact on viability (Extended Data, Fig. 5B). This differentiation was associated to a dose-dependent increase in CEBPA mRNA levels (Fig 5A). Importantly, we observed the predominant expression of the full-length CEBPA p42 isoform, which is crucial for cell differentiation, at the expense of the truncated p30 isoform that fails to induce differentiation and increases cell proliferation of myeloid progenitors (Fig 5B). This result shows that calcitriol modulates the isoform ratio and appears thus as a relevant model for studying myeloid differentiation driven by p42. Calcitriol treatment induced a decrease in both BCAT1 protein levels and *BCAT1* transcripts (Fig 5B and 5D), showing that BCAT1 downregulation is concomitant to the increased proportion of p42/p30 (Fig. 5C). Upon calcitriol treatment, BCAT1 invalidation (shRNA) dramatically affected the cell proliferation (Extended Data Fig. 5E) and viability (Extended Data, Fig. 5F) of PLB-985 cell line compared to shCTRL. We found that upon calcitriol treatment, *BCAT1* invalidation, affected CEBP $\alpha$  protein level (Fig. 5E, Extended Data, Fig. 5I) and majored the accumulation of p42 isoform (Fig. 5G) compared to p30 isoform (Fig. 5H). Consistent with an increased p42/p30 ratio (Fig. 5F), BCAT1 invalidation upon calcitriol exposure favored myeloid differentiation (Fig. 5G). Thus, BCAT1 activity *per se* participates in the control of myeloid differentiation in a CEBPA-dependent manner. Interestingly, this process also inhibits MYC accumulation (Fig. 5H).

Interestingly, primary *IDH2m* AML cells retain the expression of p30 when compared to their *IDH2wt* counterparts (Fig. 5I). We also observed that upon calcitriol exposure, a *CEBPA* invalidation (Extended Data, Fig. 5J) affected cell proliferation (Extended data, Fig. 5K) but not cell viability (Extended Data, Fig. 5L) of PLB-985 cell line. We found that upon calcitriol treatment, *CEBPA* invalidation decreased p42 (Extended Data, Fig5. M) and p30 isoforms (Extended Data, Fig. 5N). Surprisingly, *CEBPA* invalidation enhanced p42/p30 ratio (Extended Data, Fig. 5O) associated with a partial myeloid differentiation (Extended Data, Fig5. P). These results suggested that myeloid differentiation is controlled by CEBP $\alpha$  p42 isoform. Since the p30 isoform has transcriptional targets independent of the p42 isoform, over-expression of the p30 isoform may lead to activation of specific genetic programs that

contribute to maintain AML *IDH2m* cells in a state of proliferation, with BCAT1/mTORC1 might play an integral role.

## DISCUSSION

We have identified BCAT1 activity as limiting for *IDHm* AML cell proliferation and found that this metabolic dependency could be selectively targeted for therapeutic gain. Over time after *BCAT1* ablation, a progressive clearance of *IDHm* AML cells is observed in xenografted mice, that results from a proliferation arrest and differentiation induction, a dual mechanism that has also been observed in AML blasts upon inhibition of the *dihydroorotate dehydrogenase (DHODH)* involved in *de novo* pyrimidine synthesis pathway<sup>69 70</sup>.

A growing body of evidence indicates that leukemic cells show dependency to amino acid metabolic pathways. For instance, they exhibit increased requirement of nonessential amino acids, as is the case for arginine or the catabolic product of BCAA, i.e. the glutamine, and therapeutic targets in these metabolic pathways have been proposed (reviewed by<sup>71 72 73</sup>). Leucine has been involved in *MLL-AF9* AML development and progression in a xenografted model, as enhanced leukemic cell death induced by inhibition of the solute carrier family 1 member 5 (SLC1A5/ASCT2) responsible for taking up several amino acids is attributed to decreased leucine influx and inhibition of mTOR<sup>74</sup>. BCAA availability plays a role in cell cycle regulation, through activation of the mTORC1 signaling by the CD98 heavy chain (CD98hc, encoded by *SLC3A2*)<sup>75 76</sup>, a transmembrane protein required for adhesion and survival of AML cells<sup>77</sup> and that, together with SLC7A5, forms the L-type amino acid transporter 1 (LAT1). Altered BCAA utilization has been illustrated in multiple cancers (reviewed by<sup>78</sup>) as in drug resistance<sup>79 44</sup>. The directionality of this pathway depends on key variables as the mutational landscape or the tissue of origin that dictate the metabolic status and nutriment demands. For instance, loss of BCAA catabolism and suppression of *BCAT* expression goes with the development and progression of human hepatocellular carcinomas. On the opposite, upregulation of *BCAT1* accompanies the progression of *IDHwt* gliomas, where its overexpression induces BCAA catabolism and sustains an aggressive growth phenotype . Our data suggest that it is the *IDH* genetic lesion and/or the accumulation of D-2HG, that lies at the root of this metabolic feature. Indeed, our data converge *IDHm* AML samples with metabolic similarity despite their genetic heterogeneity and indicate an unexpected directionality of the BCAT1-mediated reaction leading to leucine accumulation, that help support mTOR activity and cellular growth. In *IDHm* cells, BCAA anabolism correlates to *BCAT1* overexpression, creating a selective vulnerability to pharmacological inhibition of

BCAT1 or mTORC1/2. Identification of a metabolic flux that is amenable to therapeutic targeting is an important observation stemming from this work. *BCAT1* overexpression and BCAA production are functionally required when *BCR-ABL*-driven CML evolves from a chronic phase to blast crisis, which is characterized by the rapid expansion of myeloid differentiation-arrested blasts <sup>35</sup>. Our results, together with the above-mentioned study, demonstrate that the overall flux of the BCAA metabolic pathway can be anabolic in AML, suggesting that targeting *BCAT1* may be a way to benefit patients with CML or *IDHm* AML. *BCAT1* reactivation also cooperates with *NrasG12D* to enhance BCKA to BCAA in HSCP, during progression of MPN to AML in a mice model <sup>37</sup>. In human *IDHwt* AML, *BCAT1* overexpression regulates BCAA catabolism in the critical LSC population <sup>36</sup>, again opening a path to develop therapeutic strategies to selectively eradicate LSC. In line, LSC harbor a high level of amino acids and are more sensitive to amino acid loss for oxidative phosphorylation (OXPHOS) and survival <sup>80</sup> compared with AML blasts, indicating a nutrient dependency not present in the non-LSC bulk. This LSC-specific metabolic property could explain the deep and durable responses observed in untreated patients with AML upon treatment with the selective inhibitor of BCL-2 venetoclax in combination with azacitidine <sup>81 82</sup>, a situation that suppresses OXPHOS <sup>82</sup> but also decreases amino acids uptake and expression of amino acids transporters in LSC <sup>80</sup>. Likewise, our results show that *BCAT1* serves as a regulatory checkpoint for leucine availability in *IDHm* AML cells, suggesting that therapies that target *BCAT1* as the leucine analogue ERG240 <sup>83</sup> or that selectively deplete leucine, or even that inhibit aminopeptidase as tosedostat or bestatin which results in lowering the free amino acid levels (reviewed by <sup>84</sup>) could be useful approaches to target *IDHm* AML, together with BCL-2 inhibition <sup>22</sup>. Our observations also highlight an underappreciated consequence of the presence of *IDH* mutation in AML bulk, in creating leucine dependency and mimicking an LSC-like metabolic activity for *IDHm* AML cells. Importantly, *IDH* mutation can be found in the pre-leukemic HSPC that are ancestral to the dominant AML clone and from which AML evolves <sup>85 86 87 88</sup>. Similar to LSC, these pre-malignant HSC are associated to induction chemotherapy survival and bone marrow persistence at remission <sup>86</sup>. Whether similar metabolic dependency would manifest in this cellular subset remains to be determined. Finally, BCAA metabolism contributes to hematopoietic system homeostasis. Valine and leucine are required for HSCP maintenance in the bone marrow niche <sup>89</sup> and sustained uptake of leucine accompanies T cell differentiation <sup>90</sup>. *Bcat1* is required to sustain the

repopulation ability of HSCs in reconstitution experiment in mice, and BCAA catabolism maintains HSC quiescence <sup>91</sup>. Leucine dependency could impact the behavior of *IDHm* HSCP that undergo clonal expansion during ageing in healthy individuals who do not develop AML, a phenomenon referred to as age-related clonal hematopoiesis <sup>92</sup>, or *IDHm* HSCP that could expand post-chemotherapy <sup>93</sup>. Further studies targeting *BCAT1* in myeloid diseases will improve our understanding of dietary amino acid and nutrient signal contribution to pathological myelopoiesis.



## MATERIALS AND METHODS

### Cell lines

PLB-985 and K562 cell lines were cultured in Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Gibco), L-glutamine (2mM, Gibco) and penicillin/streptomycin (100µg/mL, Gibco). Human embryonic kidney (HEK) 293T cells used for lentiviral production were grown in Dulbecco Modified Eagle Medium (Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Gibco), L-glutamine (2mM, Gibco) and penicillin/streptomycin (100µg/mL, Gibco). Cell lines were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>.

### Human primary samples

Peripheral blood and/or bone marrow aspirates samples were obtained at time of diagnosis from the department of Hematology, Gustave Roussy (Villejuif, France). Immunophenotyping and cytogenetic analyses were done locally. Bone marrow samples were enriched in AML blast cells using Ficoll gradient density centrifugation. For AML patient samples with less than 70% of leukemic blasts, blasts identified as CD45<sup>int</sup>/SSC<sup>low</sup> were sorted using a BD FACSAria III Cell Sorter (BD Biosciences, Imaging and Cytometry Platform, Gustave Roussy). Cells were cultured in serum-free conditions Stemspan medium (StemCell Technologies) in the presence of recombinant human cytokines (25ng/ml hSCF; 20ng/ml hGCSF; 5ng/ml human hGM-CSF; 10ng/ml hFLT3-L; 10ng/ml hIL3; hIL6 10ng/ml; 1UI/ml hEPO and 10ng/ml hTPO), all from PeproTech France (Neuilly s/Seine, France).

Characteristics of patient samples and their applications are provided in supplemental Table 1.

### Chemicals

(2R)-Octyl- $\alpha$ -hydroxyglutarate ester (16366, Cayman Chemical) was solubilized in Phosphate-Buffered Saline (Gibco). Cells were plated at 1 million/mL and daily diluted in medium supplemented with (2R)-Octyl HG. Calcitriol (SE-S1466, Euromedex) was solubilized in dymethylsulfoxide (Merck). BCAT1 inhibitors were BCATc inhibitor 2 (Cayman Chemical, 9002002) and Gabapentin (Tokyo Chemical Industry Co.) and diluted in dymethylsulfoxide (DMSO). Inhibitors GSK458 (S2658), PP242 (S2218) and rapamycin (S1039) were purchased from Selleckchem.

### Western Blot analysis

Briefly, cells were placed on ice and washed twice with chilled PBS/orthovanadate 1mM. Total proteins were extracted using NP-40 (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 2mM EDTA, 1% Nonidet P-40) supplemented with protease (Complete EDTA-free 1X, 11873580001, ThermoScientific; PMSF 1mM) and phosphatase (orthovanadate 1mM; 10mM NaF) inhibitors cocktails and quantified with the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (#23225, ThermoScientific). 10µg (patient samples) or 20µg (cell lines) of proteins were resolved by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose 0.22µm membrane (Biorad). Membranes were blocked with 1X PBS, 0,1% Tween20, 5% non-fat milk powder or 5% BSA powder, then incubated with primary antibody as described in (Supplemental Table 2). Horse peroxidase-conjugated secondary antibodies (Supplemental Table 2) were used to detect proteins by LAS4000 digital imager (GR Healthcare Life Sciences) upon incubation with enhancer chemiluminescence kit (ThermoScientific). Stripping was performed in 1X stripping buffer (ST010, Geba) according to manufacturer instructions.

### BCAA tracings

Cells were cultured and labeled in media supplemented with either 170 µM [(U)-13C]-L-Leucine, 30 or 170 µM [(U)-13C]- KIC sodium salt (for 13C tracer experiments; Cambridge Isotope Laboratories). The concentrations are based on the standard RPMI-1640 media formulation. At the time of collection (0, 30 and 60 minutes respectively), cells were washed twice with ice-cold PBS and iced shocked in liquid azote. After thawing, insoluble particles by centrifugation were removed by centrifugation the supernatants were collected and dried using a SpeedVac at 30°C. The cell extracts were dissolved. Calibration samples (150–250 mM) were prepared from 98% 15N-enriched leucine (Isotec Inc.) and 13C-enriched KIC and 13C,15N-enriched leucine. All signals were identified either with authentic samples or by reference to literature values. These analyses were realized by Pr Ottolenghi Chris (Hopital Necker, service de biochimie analytique, Paris).

### Intracellular 2HG quantification

Cells were treated during three days with indicated doses of (2R)-Octyl- $\alpha$ -hydroxyglutarate ester (16366, Cayman Chemical). 300,000 cells per condition were washed twice with

Phosphate-Buffered Saline (Gibco). D2-HG quantifications were performed following a fully validated analytical method according to the EMA (European Medicine Agency) guideline as described in<sup>94</sup>

#### Lentiviral production and transduction

Lentiviruses expressing wild type *IDH2* or *IDH2<sup>R140Q</sup>* were produced and used as previously reported<sup>63</sup>. Expressions of *BCAT1* and *CEBP $\alpha$*  have been silenced using lentiviruses expressing shRNA. Briefly, lentiviral production was performed by co-transfection of pMD2.G, pCMV-Gag-Pol and FG12-GFP-shLuc(shCTRL), FG12 GFP shBCAT1-d<sup>35</sup>, LT3-Gepir-GFP-shRenilla (shCTRL) or LT3-Gepir GFPshCEBP $\alpha$ -3 into sub-confluent HEK293T cells using Jetprime<sup>TM</sup> (PolyPlus). Lentiviral particles were harvested 48h post-transfection and concentrated with ultracentrifugation at 80,000  $\times g$  for 70 min at 4 °C. Human primary bone marrow or blood cells were transduced 48h with lentiviral particles expressing shBCAT1, or 24h with viruses expressing shRNA against *CEBP $\alpha$* . Then, cells infected with shCEBP $\alpha$ -expressing lentiviral particles were selected with puromycin (0,5 $\mu$ g/mL, Invivogen) for five days and shRNA and GFP expression were induced with doxycyclin (0,5 $\mu$ g/mL, Sigma-Aldrich) for 24h. GFP-positive cells were sorted on BD FACSAria III cell sorter and GFP positivity was checked before each experiment.

#### Patient derived xenograft (PDX) models and In Vivo Imaging

All animal studies were conducted with approval of the local ethics committee. For *BCAT1* knockdown PDX model, human primary AML cells were transduced with either shRNACtrl or shRNABcat1d-expressing lentiviruses for 48 h. Infected cells were sorted based on GFP expression, and 0.5-1 $\times 10^6$  cells were injected into the femoral cavity in sublethally irradiated (1.5 Gy) NOD SCID IL2Rgammanull (NSG) mice. After transplantation, recipient mice were monthly evaluated by marrow biopsy to assess PDX engraftment. Mice were sacrificed when marrow or blood infiltration reach at least 80% or at any sign of clinical deterioration. At sacrifice, spleen and bone marrow cells were harvested and analyzed by flow cytometry and histopathology. *In vivo* inhibition of AML growth by mTOR signaling inhibitor GSK428 has been evaluated in a PDX model. First, Human primary AML samples carrying *IDH1/2wt* or *IDH2R140Q* mutation were transduced with pFUW-Luc-mCherry lentivirus. mCherry positive cells were sorted on FACS Aria (BD) and then transplanted in NSG recipients as previously

described. Then, mice received a daily oral gavage of GSK428 (3mg/kg) or vehicle for a month. Engraftment was evaluated every week post-transplantation either by flow cytometry after red blood cell lysis to quantify levels of human circulating cells expressing the human CD45 (hCD45<sup>+</sup>) antigen in peripheral blood or bone marrow cells, or by In Vivo Imaging System (IVIS Spectrum, Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA) (see below). For *in vivo* imaging, mice were treated by intraperitoneal injection (150 mg/kg in PBS) of the D-luciferin substrate (Promega). The anesthetized mice were placed onto warmed stage inside the light tight IVIS 50 box. The IVIS 50 camera system was used to visualize bone marrow tumors, and photon measurement was defined for the entire bodies and quantified using Living Image software (Xenogen for Caliper Life Science SA, Villepinte, France). Data are represented as the average fluorescence or bioluminescence intensity for eight mice at each given time point, with error bars indicating standard error of the mean. Significance was determined by the student t-test. After 1 month or in case of morbidity signs, mice were sacrificed, and AML cell burden was measured by flow cytometry and sorted based on hCD45 staining.

#### Cell Apoptosis/Necrosis Assay (Annexin-V-FITC and 7-AAD Staining)

To assess cell viability, Annexin-V-FITC and 7-AAD staining (BD Biosciences, San Jose, CA) were applied according to the manufacturer's instructions. Within 1 hour of staining, specimens were analyzed by flow cytometry on a Fortessa Flow Cytometer (BD). Cell viability was assessed as a percentage and categorized as follows: viable (double negative), early apoptotic (Annexin-V-FITC positive, 7AAD negative), and late apoptotic and necrotic (Annexin-V-FITC negative/7-AAD positive or double positive, respectively). Data were analyzed using Flowjo (BD biosciences) software.

#### Flow Cytometry

Conventional Flow Cytometry was used to evaluate the phenotype of human AML samples or PLB-985 cell lines. For human AML cells, briefly, cells were washed with PBS, supplemented with 2% SVF and Fcblocked with 0.1 $\mu$ l of human IgG/10<sup>5</sup> cells for 15 min at room temperature (Human TruStain FcX Fc Receptor Blocking Solution, BioLegend) prior to staining. Human samples were analyzed by a five-color flow cytometry panel, including: phycoerythrin (PE)-conjugated anti-human CD11b (BD Biosciences, clone ICRF44), FITC-conjugated anti-human CD14 (BD Biosciences, clone 61D) APC-conjugated anti-human CD15

(BD Biosciences, VIMC15), PerCP-Cy5-conjugated anti-human CD24 antibodies (BD Biosciences, clone ML05), PeCy7-conjugated anti-human CD34 (BD Biosciences, clone 8G12). For PLB-985 samples, cells were analysed by five- or eight-color flow cytometry panels, enabling the measure of GFP fluorescent protein and extracellular antigens expression. The panels included fluorochrome-conjugate antibodies, as follows, tube 1 : PE-conjugated anti-human CD33 (ThermoFischer Scientific, 12-0339-42), BV711-conjugated anti-human CD13 (BD Biosciences, 745496), APC-conjugated anti-human CD36 (BD biosciences, 550956) ; tube 2 : PE-conjugated anti-human CD11b (Biolegend, 301306), PE-Cy7-conjugated anti-human CD45 (BD biosciences, 557748), APC-conjugated anti-human CD15 (BD Biosciences, 551376), APC-Cy7-conjugated anti-human CD14 (BD Biosciences, 557831), BUV395-conjugated anti-human CD16 (BD Biosciences, 563785). All antibodies were used per recommendations of the manufacturers. Cells were incubated with antibody cocktails for up to 1 hour on ice, washed with PBS and stained with either Sytox or DAPI. Total events were acquired on a BD LSRFortessa™ (BD Biosciences) analyzed using Flowjo software (BD Biosciences).

RNA extraction and quantification by real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

The extraction and purification of total RNA was performed using either the Total RNA Purification Plus Kit (#48300, Norgen Biotek), the RNA/DNA Purification Kit (#48700, Norgen Biotek) or RNA/DNA Purification Micro Kit (#50300, Norgen Biotek), depending on the number of cells or requirement of RNA and DNA. cDNA was synthesized using a SuperScript IV Reverse Transcriptase (Invitrogen). RT-qPCR was performed and analyzed on the 7500 Fast Real-Time PCR System or Quant Studio 5 (Applied Biosystems) using SYBR™ Select Master Mix (Applied Biosystems). Primer sequences are given in Supplemental Table 3. mRNA expression levels were normalized to *PPIA* and *β2M* mRNA levels by the comparative Ct method using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formula.

gDNA Extraction and Global DNA Methylation Analysis.

gDNA was extracted using the Genomic DNA Isolation Kit (Norgen Biotek). 1,2μg of gDNA was digested during 4 hours for cell lines and 1 hour for patient samples according to the protocol. Global DNA methylation was measured using the EpiJet DNA Methylation Analysis Kit (#K1441, Thermo Scientific). qPCR was performed on the 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using home-designed oligonucleotides (primers listed in Supplemental Table 4) and SYBR™ Select Master Mix (Applied Biosystems). Results are

expressed as % of 5 methylcytosine.

#### Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)-qPCR

ChIP was performed at the Centre de recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM) as previously described<sup>95</sup>. gDNA from mutant and wild type *IDH2* AML samples were obtained from Drs Sylvain Garciaz and Estelle Duprez. qPCR was performed on the 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) using home-designed oligonucleotides (primers listed in Supplemental Table 5) and SYBR™ Select Master Mix (Applied Biosystems). Immunoprecipitated DNA is compared to input sample by the comparative Ct method. Immunoprecipitated DNA enrichment is expressed as % of input.

#### RNA-Seq library construction

RNA quality was evaluated using an Agilent Fragment Analyser apparatus as described in the manufacturer's procedure (Agilent Technologies, Basel, Switzerland) and Invitrogen Qubit fluorometer was used to quantify RNA. Libraries were prepared by following the SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit (Takara Bio USA, Mountain View, CA, USA). Nextera XT kit (Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA) was used to make cDNA libraries suitable for Illumina sequencing. Libraries were sequenced on Illumina HiSeq 4000 as 50 bp single end reads following Illumina's instructions. Sequencing was performed to obtain at least  $4.0 \times 10^7$  reads for each sample. Reads were preprocessed to remove adapter, polyA and low-quality sequences (Phred quality score below 20). After this preprocessing, reads shorter than 40 bases were discarded for further analysis. These preprocessing steps were performed using cutadapt<sup>96</sup> version 1.10. Reads were mapped onto the hg19 assembly of Homo sapiens genome using STAR<sup>97</sup> version 2.5.3a. Gene expression quantification was performed from uniquely aligned reads using htseq-count<sup>98</sup> version 0.6.1p1, with annotations from Ensembl version 75 and "\union" mode2. Only non-ambiguously assigned reads have been retained for further analyses. Read counts have been normalized across samples with the median-of-ratios method proposed by Anders and Huber<sup>99</sup>, to make these counts comparable between samples.

#### RNA-seq analysis

TPM values were obtained using kallisto<sup>100</sup> and gene counts were generated using the tximport Bioconductor package<sup>101</sup> in R with the tx2gene option set to accomplish gene-level

summarization. Differential analyses were performed using DeSeq2 Bioconductor package<sup>102</sup>, selecting genes with an adjusted p-value under 0,05 as significant for each treatment against DMSO. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) was performed as implemented in the fgsea Bioconductor package<sup>103</sup>, using KEGG<sup>104</sup>, GSEA c6 and hallmarks<sup>105,106</sup>, Gene Ontology<sup>107,108</sup> and TTRUST<sup>109</sup> databases annotations downloaded from GSEA and enrichR<sup>110</sup> websites.

#### Methylation and expression datasets

DNA methylation analysis were performed upon publicly available TCGA LAML dataset<sup>111</sup> (Illumina Infinium HumanMethylation450 beadchips) using pre-processed beta-values. RNA expression analyses were performed using both TCGA LAML and OHSU Beat-AML<sup>112</sup> cohort datasets from RNA-sequencing. Expression data were downloaded as raw counts dataset and then normalized using the upper-quartile method. DNA methylation and RNA expression datasets were downloaded from Viziome (<http://vizome.org/aml/>) and The Cancer Genome Atlas (TCGA) (<http://cancergenome.nih.gov/>).

#### Survival analysis

BEAT AML and TCGA datasets were used to assess *BCAT1* expression on overall survival. Samples were stratified according to genotype and *BCAT1* expression (high, above median; low, below median). Survival analysis used a Mantel-Cox log-rank test and a hazard-ratio (log-rank) test using GraphPad Prism 7 software.

## REFERENCES

1. Dang, L., White, D.W., Gross, S., Bennett, B.D., Bittinger, M.A., Driggers, E.M., Fantin, V.R., Jang, H.G., Jin, S., Keenan, M.C., et al. (2009). Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 462, 739–744. nature08617 [pii] 10.1038/nature08617 [doi].
2. Ward, P.S., Patel, J., Wise, D.R., Abdel-Wahab, O., Bennett, B.D., Collier, H.A., Cross, J.R., Fantin, V.R., Hedvat, C.V., Perl, A.E., et al. (2010). The Common Feature of Leukemia-Associated IDH1 and IDH2 Mutations Is a Neomorphic Enzyme Activity Converting  $\alpha$ -Ketoglutarate to 2-Hydroxyglutarate. *Cancer Cell* 17, 225–234. 10.1016/j.ccr.2010.01.020.
3. Gross, S., Cairns, R.A., Minden, M.D., Driggers, E.M., Bittinger, M.A., Jang, H.G., Sasaki, M., Jin, S., Schenkein, D.P., Su, S.M., et al. (2010). Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *J Exp Med* 207, 339–344. jem.20092506 [pii] 10.1084/jem.20092506 [doi].
4. Bunse, L., Pusch, S., Bunse, T., Sahm, F., Sanghvi, K., Friedrich, M., Alansary, D., Sonner, J.K., Green, E., Deumelandt, K., et al. (2018). Suppression of antitumor T cell immunity by the oncometabolite (R)-2-hydroxyglutarate. *Nature Medicine* 24, 1192–1203. 10.1038/s41591-018-0095-6.
5. Friedrich, M., Sankowski, R., Bunse, L., Kilian, M., Green, E., Ramallo Guevara, C., Pusch, S., Poschet, G., Sanghvi, K., Hahn, M., et al. (2021). Tryptophan metabolism drives dynamic immunosuppressive myeloid states in IDH-mutant gliomas. *Nat Cancer* 2, 723–740. 10.1038/s43018-021-00201-z.
6. Figueroa, M.E., Abdel-Wahab, O., Lu, C., Ward, P.S., Patel, J., Shih, A., Li, Y., Bhagwat, N., Vasanthakumar, A., Fernandez, H.F., et al. (2010). Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* 18, 553–567. S1535-6108(10)00483-6 [pii] 10.1016/j.ccr.2010.11.015 [doi].
7. Xu, W., Yang, H., Liu, Y., Yang, Y., Wang, P., Kim, S.H., Ito, S., Yang, C., Xiao, M.T., Liu, L.X., et al. (2011). Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell* 19, 17–30. S1535-6108(10)00527-1 [pii] 10.1016/j.ccr.2010.12.014 [doi].
8. Chowdhury, R., Yeoh, K.K., Tian, Y.M., Hillringhaus, L., Bagg, E.A., Rose, N.R., Leung, I.K., Li, X.S., Woon, E.C., Yang, M., et al. (2011). The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases. *EMBO Rep* 12, 463–469. embor201143 [pii] 10.1038/embor.2011.43 [doi].
9. Lu, C., Ward, P.S., Kapoor, G.S., Rohle, D., Turcan, S., Abdel-Wahab, O., Edwards, C.R., Khanin, R., Figueroa, M.E., Melnick, A., et al. (2012). IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature* 483, 474–478. nature10860 [pii] 10.1038/nature10860 [doi].
10. Elkashef, S.M., Lin, A.-P., Myers, J., Sill, H., Jiang, D., Dahia, P.L.M., and Aguiar, R.C.T. (2017). IDH Mutation, Competitive Inhibition of FTO, and RNA Methylation. *Cancer Cell* 31, 619–620. 10.1016/j.ccell.2017.04.001.
11. Su, R., Dong, L., Li, C., Nachtergaele, S., Wunderlich, M., Qing, Y., Deng, X., Wang, Y., Weng, X., Hu, C., et al. (2018). R-2HG Exhibits Anti-tumor Activity by Targeting FTO/m(6)A/MYC/CEBPA Signaling. *Cell* 172, 90-105 e23. S0092-8674(17)31382-X [pii] 10.1016/j.cell.2017.11.031 [doi].
12. Dvinge, H., and Bradley, R.K. (2015). Widespread intron retention diversifies most cancer transcriptomes. *Genome Med* 7, 45. 10.1186/s13073-015-0168-9.
13. Yoshimi, A., Lin, K.-T., Wiseman, D.H., Rahman, M.A., Pastore, A., Wang, B., Lee, S.C.-W., Micol, J.-B., Zhang, X.J., de Botton, S., et al. (2019). Coordinated alterations in RNA splicing and epigenetic regulation drive leukaemogenesis. *Nature* 574, 273–277.



10.1038/s41586-019-1618-0.

14. Boutzen, H., Saland, E., Larrue, C., de Toni, F., Gales, L., Castelli, F.A., Cathebas, M., Zaghdoudi, S., Stuani, L., Kaoma, T., et al. (2016). Isocitrate dehydrogenase 1 mutations prime the all-trans retinoic acid myeloid differentiation pathway in acute myeloid leukemia. *J Exp Med* 213, 483–497. jem.20150736 [pii] 10.1084/jem.20150736 [doi].
15. Izzo, F., Lee, S.C., Poran, A., Chaligne, R., Gaiti, F., Gross, B., Murali, R.R., Deochand, S.D., Ang, C., Jones, P.W., et al. (2020). DNA methylation disruption reshapes the hematopoietic differentiation landscape. *Nat Genet* 52, 378–387. 10.1038/s41588-020-0595-4.
16. Inoue, S., Li, W.Y., Tseng, A., Beerman, I., Elia, A.J., Bendall, S.C., Lemonnier, F., Kron, K.J., Cescon, D.W., Hao, Z., et al. (2016). Mutant IDH1 Downregulates ATM and Alters DNA Repair and Sensitivity to DNA Damage Independent of TET2. *Cancer Cell* 30, 337–348. S1535-6108(16)30223-9 [pii] 10.1016/j.ccell.2016.05.018 [doi].
17. Sulkowski, P.L., Oeck, S., Dow, J., Economos, N.G., Mirfakhraie, L., Liu, Y., Noronha, K., Bao, X., Li, J., Shuch, B.M., et al. (2020). Oncometabolites suppress DNA repair by disrupting local chromatin signalling. *Nature* 582, 586–591. 10.1038/s41586-020-2363-0.
18. Sulkowski, P.L., Corso, C.D., Robinson, N.D., Scanlon, S.E., Purshouse, K.R., Bai, H., Liu, Y., Sundaram, R.K., Hegan, D.C., Fons, N.R., et al. (2017). 2-Hydroxyglutarate produced by neomorphic IDH mutations suppresses homologous recombination and induces PARP inhibitor sensitivity. *Sci Transl Med* 9, 9/375/eaal2463 [pii] 10.1126/scitranslmed.aal2463 [doi].
19. Gbyli, R., Song, Y., Liu, W., Gao, Y., Biancon, G., Chandhok, N.S., Wang, X., Fu, X., Patel, A., Sundaram, R., et al. (2022). In vivo anti-tumor effect of PARP inhibition in IDH1/2 mutant MDS/AML resistant to targeted inhibitors of mutant IDH1/2. *Leukemia*. 10.1038/s41375-022-01536-x.
20. Fu, X., Chin, R.M., Vergnes, L., Hwang, H., Deng, G., Xing, Y., Pai, M.Y., Li, S., Ta, L., Fazlollahi, F., et al. (2015). 2-Hydroxyglutarate Inhibits ATP Synthase and mTOR Signaling. *Cell Metab* 22, 508–515. S1550-4131(15)00276-4 [pii] 10.1016/j.cmet.2015.06.009 [doi].
21. Li, F., He, X., Ye, D., Lin, Y., Yu, H., Yao, C., Huang, L., Zhang, J., Wang, F., Xu, S., et al. (2015). NADP(+)-IDH Mutations Promote Hypersuccinylation that Impairs Mitochondria Respiration and Induces Apoptosis Resistance. *Mol Cell* 60, 661–675. S1097-2765(15)00808-4 [pii] 10.1016/j.molcel.2015.10.017 [doi].
22. Chan, S.M., Thomas, D., Corces-Zimmerman, M.R., Xavy, S., Rastogi, S., Hong, W.J., Zhao, F., Medeiros, B.C., Tyvoll, D.A., and Majeti, R. (2015). Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations induce BCL-2 dependence in acute myeloid leukemia. *Nat Med* 21, 178–184. nm.3788 [pii] 10.1038/nm.3788 [doi].
23. Stuani, L., Sabatier, M., Saland, E., Cognet, G., Poupin, N., Bosc, C., Castelli, F.A., Gales, L., Turtoi, E., Montersino, C., et al. (2021). Mitochondrial metabolism supports resistance to IDH mutant inhibitors in acute myeloid leukemia. *Journal of Experimental Medicine* 218, e20200924. 10.1084/jem.20200924.
24. McBrayer, S.K., Mayers, J.R., DiNatale, G.J., Shi, D.D., Khanal, J., Chakraborty, A.A., Sarosiek, K.A., Briggs, K.J., Robbins, A.K., Sewastianik, T., et al. (2018). Transaminase Inhibition by 2-Hydroxyglutarate Impairs Glutamate Biosynthesis and Redox Homeostasis in Glioma. *Cell* 175, 101-116.e25. 10.1016/j.cell.2018.08.038.
25. Mugoni, V., Panella, R., Cheloni, G., Chen, M., Pozdnyakova, O., Stroopinsky, D., Guarnerio, J., Monteleone, E., Lee, J.D., Mendez, L., et al. (2019). Vulnerabilities in mIDH2 AML confer sensitivity to APL-like targeted combination therapy. *Cell Res* 29, 446–459. 10.1038/s41422-019-0162-7.
26. Emadi, A., Jun, S.A., Tsukamoto, T., Fathi, A.T., Minden, M.D., and Dang, C.V.

- (2014). Inhibition of glutaminase selectively suppresses the growth of primary acute myeloid leukemia cells with IDH mutations. *Experimental Hematology* 42, 247–251. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2013.12.001>.
27. Tateishi, K., Wakimoto, H., Iafrate, A.J., Tanaka, S., Loebel, F., Lelic, N., Wiederschain, D., Bedel, O., Deng, G., Zhang, B., et al. (2015). Extreme Vulnerability of IDH1 Mutant Cancers to NAD<sup>+</sup> Depletion. *Cancer Cell* 28, 773–784. S1535-6108(15)00427-4 [pii] 10.1016/j.ccell.2015.11.006 [doi].
28. Konopleva, M., Pollyea, D.A., Potluri, J., Chyla, B., Hogdal, L., Busman, T., McKeegan, E., Salem, A.H., Zhu, M., Ricker, J.L., et al. (2016). Efficacy and Biological Correlates of Response in a Phase II Study of Venetoclax Monotherapy in Patients with Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Discov* 6, 1106. 10.1158/2159-8290.CD-16-0313.
29. DiNardo, C.D., Jonas, B.A., Pullarkat, V., Thirman, M.J., Garcia, J.S., Wei, A.H., Konopleva, M., Döhner, H., Letai, A., Fenaux, P., et al. (2020). Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 383, 617–629. 10.1056/NEJMoa2012971.
30. Stein, E.M., DiNardo, C.D., Pollyea, D.A., Fathi, A.T., Roboz, G.J., Altman, J.K., Stone, R.M., DeAngelo, D.J., Levine, R.L., Flinn, I.W., et al. (2017). Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 130, 722–731. blood-2017-04-779405 [pii] 10.1182/blood-2017-04-779405 [doi].
31. DiNardo, C.D., Stein, E.M., de Botton, S., Roboz, G.J., Altman, J.K., Mims, A.S., Swords, R., Collins, R.H., Mannis, G.N., Pollyea, D.A., et al. (2018). Durable Remissions with Ivosidenib in IDH1-Mutated Relapsed or Refractory AML. *New England Journal of Medicine* 378, 2386–2398. 10.1056/NEJMoa1716984.
32. Lachowicz, C.A., Borthakur, G., Loghavi, S., Zeng, Z., Kadia, T.M., Masarova, L., Takahashi, K., Tippet, G.D., Smith, S., Garcia, J.S., et al. (2021). A phase Ib/II study of ivosidenib with venetoclax +/- azacitidine in IDH1-mutated myeloid malignancies. *JCO* 39, 7012–7012. 10.1200/JCO.2021.39.15\_suppl.7012.
33. Venugopal, S., Takahashi, K., Daver, N., Maiti, A., Borthakur, G., Loghavi, S., Short, Nicholas.J., Ohanian, M., Masarova, L., Issa, G., et al. (2022). Efficacy and safety of enasidenib and azacitidine combination in patients with IDH2 mutated acute myeloid leukemia and not eligible for intensive chemotherapy. *Blood Cancer J.* 12, 10. 10.1038/s41408-021-00604-2.
34. Cathelin, S., Sharon, D., Subedi, A., Cojocari, D., Phillips, D.C., Levenson, J.D., MacBeth, K.J., Nicolay, B., Narayanaswamy, R., Ronseaux, S., et al. (2022). Enasidenib-induced differentiation promotes sensitivity to venetoclax in IDH2-mutated acute myeloid leukemia. *Leukemia* 36, 869–872. 10.1038/s41375-021-01468-y.
35. Hattori, A., Tsunoda, M., Konuma, T., Kobayashi, M., Nagy, T., Glushka, J., Tayyari, F., McSkimming, D., Kannan, N., Tojo, A., et al. (2017). Cancer progression by reprogrammed BCAA metabolism in myeloid leukaemia. *Nature* 545, 500–504. nature22314 [pii] 10.1038/nature22314 [doi].
36. Raffel, S., Falcone, M., Kneisel, N., Hansson, J., Wang, W., Lutz, C., Bullinger, L., Poschet, G., Nonnenmacher, Y., Barnert, A., et al. (2017). BCAT1 restricts alphaKG levels in AML stem cells leading to IDHmut-like DNA hypermethylation. *Nature* 551, 384–388. nature24294 [pii] 10.1038/nature24294 [doi].
37. Gu, Z., Liu, Y., Cai, F., Patrick, M., Zmajkovic, J., Cao, H., Zhang, Y., Tasdogan, A., Chen, M., Qi, L., et al. (2019). Loss of EZH2 Reprograms BCAA Metabolism to Drive Leukemic Transformation. *Cancer Discov*, candisc;2159-8290.CD-19-0152v3. 10.1158/2159-8290.CD-19-0152.
38. Tyner, J.W., Tognon, C.E., Bottomly, D., Wilmot, B., Kurtz, S.E., Savage, S.L., Long, N., Schultz, A.R., Traer, E., Abel, M., et al. (2018). Functional genomic landscape of acute

- myeloid leukaemia. *Nature* 562, 526–531. 10.1038/s41586-018-0623-z.
39. The Cancer Genome Atlas Research Network (2013). Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 368, 2059–2074. 10.1056/NEJMoa1301689.
  40. Tonjes, M., Barbus, S., Park, Y.J., Wang, W., Schlotter, M., Lindroth, A.M., Pleier, S.V., Bai, A.H., Karra, D., Piro, R.M., et al. (2013). BCAT1 promotes cell proliferation through amino acid catabolism in gliomas carrying wild-type IDH1. *Nat Med* 19, 901–908. nm.3217 [pii] 10.1038/nm.3217 [doi].
  41. Oda, M., Glass, J.L., Thompson, R.F., Mo, Y., Olivier, E.N., Figueroa, M.E., Selzer, R.R., Richmond, T.A., Zhang, X., Dannenberg, L., et al. (2009). High-resolution genome-wide cytosine methylation profiling with simultaneous copy number analysis and optimization for limited cell numbers. *Nucleic Acids Res.* 37, 3829–3839. 10.1093/nar/gkp260.
  42. Laugesen, A., Højfeldt, J.W., and Helin, K. (2019). Molecular Mechanisms Directing PRC2 Recruitment and H3K27 Methylation. *Molecular Cell* 74, 8–18. 10.1016/j.molcel.2019.03.011.
  43. Court, F., Le Boiteux, E., Fogli, A., Müller-Barthélémy, M., Vauris-Barrière, C., Chautard, E., Pereira, B., Biau, J., Kemeny, J.-L., Khalil, T., et al. (2019). Transcriptional alterations in glioma result primarily from DNA methylation-independent mechanisms. *Genome Res.* 29, 1605–1621. 10.1101/gr.249219.119.
  44. Wang, Y., Zhang, J., Ren, S., Sun, D., Huang, H.-Y., Wang, H., Jin, Y., Li, F., Zheng, C., Yang, L., et al. (2019). Branched-Chain Amino Acid Metabolic Reprogramming Orchestrates Drug Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. *Cell Reports* 28, 512–525.e6. 10.1016/j.celrep.2019.06.026.
  45. Hutson, S.M., Berkich, D., Drown, P., Xu, B., Aschner, M., and LaNoue, K.F. (2002). Role of Branched-Chain Aminotransferase Isoenzymes and Gabapentin in Neurotransmitter Metabolism. *Journal of Neurochemistry* 71, 863–874. 10.1046/j.1471-4159.1998.71020863.x.
  46. Dong, Y., Tu, R., Liu, H., and Qing, G. (2020). Regulation of cancer cell metabolism: oncogenic MYC in the driver’s seat. *Sig Transduct Target Ther* 5, 124. 10.1038/s41392-020-00235-2.
  47. Yue, M., Jiang, J., Gao, P., Liu, H., and Qing, G. (2017). Oncogenic MYC Activates a Feedforward Regulatory Loop Promoting Essential Amino Acid Metabolism and Tumorigenesis. *Cell Reports* 21, 3819–3832. 10.1016/j.celrep.2017.12.002.
  48. Lin, X., Tan, S., Fu, L., and Dong, Q. (2020). BCAT1 Overexpression Promotes Proliferation, Invasion, and Wnt Signaling in Non-Small Cell Lung Cancers. *OTT Volume* 13, 3583–3594. 10.2147/OTT.S237306.
  49. Muto, T., Guillaumot, M., Yeung, J., Fang, J., Bennett, J., Nadorp, B., Lasry, A., Redondo, L.Z., Choi, K., Gong, Y., et al. (2022). TRAF6 functions as a tumor suppressor in myeloid malignancies by directly targeting MYC oncogenic activity. *Cell Stem Cell* 29, 298–314.e9. 10.1016/j.stem.2021.12.007.
  50. Benvenisty, N., Leder, A., Kuo, A., and Leder, P. (1992). An embryonically expressed gene is a target for c-Myc regulation via the c-Myc-binding sequence. *Genes & Development* 6, 2513–2523. 10.1101/gad.6.12b.2513.
  51. Wolfson, R.L., and Sabatini, D.M. (2017). The Dawn of the Age of Amino Acid Sensors for the mTORC1 Pathway. *Cell Metabolism* 26, 301–309. 10.1016/j.cmet.2017.07.001.
  52. Hsieh, H.-J., Zhang, W., Lin, S.-H., Yang, W.-H., Wang, J.-Z., Shen, J., Zhang, Y., Lu, Y., Wang, H., Yu, J., et al. (2018). Systems biology approach reveals a link between mTORC1 and G2/M DNA damage checkpoint recovery. *Nat Commun* 9, 3982. 10.1038/s41467-018-05639-x.

53. Lamm, N., Rogers, S., and Cesare, A.J. (2019). The mTOR pathway: Implications for DNA replication. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 147, 17–25. 10.1016/j.pbiomolbio.2019.04.002.
54. Jewell, J.L., Kim, Y.C., Russell, R.C., Yu, F.-X., Park, H.W., Plouffe, S.W., Tagliabracchi, V.S., and Guan, K.-L. (2015). Differential regulation of mTORC1 by leucine and glutamine. *Science* 347, 194–198. 10.1126/science.1259472.
55. Saxton, R.A., Knockenhauer, K.E., Wolfson, R.L., Chantranupong, L., Pacold, M.E., Wang, T., Schwartz, T.U., and Sabatini, D.M. (2016). Structural basis for leucine sensing by the Sestrin2-mTORC1 pathway. *Science* 351, 53–58. 10.1126/science.aad2087.
56. Kimball, S.R., Gordon, B.S., Moyer, J.E., Dennis, M.D., and Jefferson, L.S. (2016). Leucine induced dephosphorylation of Sestrin2 promotes mTORC1 activation. *Cellular Signalling* 28, 896–906. 10.1016/j.cellsig.2016.03.008.
57. Ananieva, E.A., Patel, C.H., Drake, C.H., Powell, J.D., and Hutson, S.M. (2014). Cytosolic Branched Chain Aminotransferase (BCATc) Regulates mTORC1 Signaling and Glycolytic Metabolism in CD4+T Cells. *J. Biol. Chem.* 289, 18793–18804. 10.1074/jbc.M114.554113.
58. Martin, S.B., Reiche, W.S., Fifelski, N.A., Schultz, A.J., Stanford, S.J., Martin, A.A., Nack, D.L., Radlwimmer, B., Boyer, M.P., and Ananieva, E.A. (2020). Leucine and branched-chain amino acid metabolism contribute to the growth of bone sarcomas by regulating AMPK and mTORC1 signaling. *Biochem J* 477, 1579–1599. 10.1042/BCJ20190754.
59. Chin, R.M., Fu, X., Pai, M.Y., Vergnes, L., Hwang, H., Deng, G., Diep, S., Lomenick, B., Meli, V.S., Monsalve, G.C., et al. (2014). The metabolite alpha-ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR. *Nature* 510, 397–401. nature13264 [pii] 10.1038/nature13264 [doi].
60. Tabe, Y., Tafuri, A., Sekihara, K., Yang, H., and Konopleva, M. (2017). Inhibition of mTOR kinase as a therapeutic target for acute myeloid leukemia. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 21, 705–714. 10.1080/14728222.2017.1333600.
61. Ghosh, J., and Kapur, R. (2017). Role of mTORC1–S6K1 signaling pathway in regulation of hematopoietic stem cell and acute myeloid leukemia. *Experimental Hematology* 50, 13–21. 10.1016/j.exphem.2017.02.004.
62. Feldman, M.E., Apsel, B., Uotila, A., Loewith, R., Knight, Z.A., Ruggero, D., and Shokat, K.M. (2009). Active-Site Inhibitors of mTOR Target Rapamycin-Resistant Outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol* 7, e1000038. 10.1371/journal.pbio.1000038.
63. Yen, K., Travins, J., Wang, F., David, M.D., Artin, E., Straley, K., Padyana, A., Gross, S., DeLaBarre, B., Tobin, E., et al. (2017). AG-221, a First-in-Class Therapy Targeting Acute Myeloid Leukemia Harboring Oncogenic IDH2 Mutations. *Cancer Discov* 7, 478–493. 2159-8290.CD-16-1034 [pii] 10.1158/2159-8290.CD-16-1034 [doi].
64. Munster, P., Aggarwal, R., Hong, D., Schellens, J.H.M., van der Noll, R., Specht, J., Witteveen, P.O., Werner, T.L., Dees, E.C., Bergsland, E., et al. (2016). First-in-Human Phase I Study of GSK2126458, an Oral Pan-Class I Phosphatidylinositol-3-Kinase Inhibitor, in Patients with Advanced Solid Tumor Malignancies. *Clin Cancer Res* 22, 1932–1939. 10.1158/1078-0432.CCR-15-1665.
65. Lee, P.Y., Sykes, D.B., Ameri, S., Kalaitzidis, D., Charles, J.F., Nelson-Maney, N., Wei, K., Cunin, P., Morris, A., Cardona, A.E., et al. (2017). The metabolic regulator mTORC1 controls terminal myeloid differentiation. *Sci. Immunol.* 2, eaam6641. 10.1126/sciimmunol.aam6641.
66. Karmaus, P.W.F., Herrada, A.A., Guy, C., Neale, G., Dhungana, Y., Long, L., Vogel, P., Avila, J., Clish, C.B., and Chi, H. (2017). Critical roles of mTORC1 signaling and metabolic reprogramming for M-CSF-mediated myelopoiesis. *Journal of Experimental*

Medicine 214, 2629–2647. 10.1084/jem.20161855.

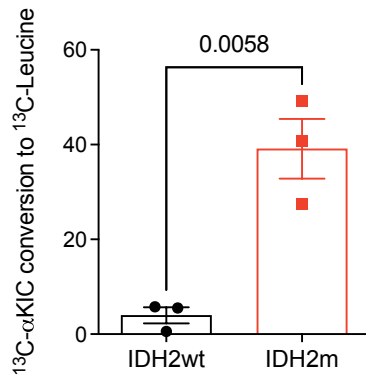
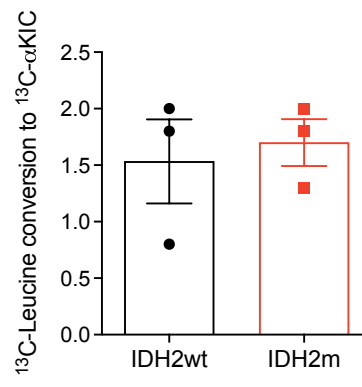
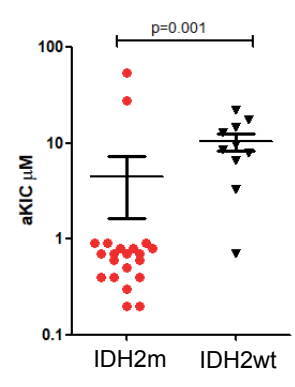
67. Zidek, L.M., Ackermann, T., Hartleben, G., Eichwald, S., Kortman, G., Kiehntopf, M., Leutz, A., Sonenberg, N., Wang, Z.-Q., von Maltzahn, J., et al. (2015). Deficiency in mTORC1-controlled C/EBP $\beta$ -mRNA translation improves metabolic health in mice. *EMBO Rep* 16, 1022–1036. 10.15252/embr.201439837.
68. Sabatier, M., Boet, E., Zaghdoudi, S., Guiraud, N., Hucteau, A., Polley, N., Cognet, G., Saland, E., Lauture, L., Farge, T., et al. (2021). Activation of Vitamin D Receptor Pathway Enhances Differentiating Capacity in Acute Myeloid Leukemia with Isocitrate Dehydrogenase Mutations. *Cancers (Basel)* 13, 5243. 10.3390/cancers13205243.
69. Sykes, D.B., Kfoury, Y.S., Mercier, F.E., Wawer, M.J., Law, J.M., Haynes, M.K., Lewis, T.A., Schajnovitz, A., Jain, E., Lee, D., et al. (2016). Inhibition of Dihydroorotate Dehydrogenase Overcomes Differentiation Blockade in Acute Myeloid Leukemia. *Cell* 167, 171–186 e15. S0092-8674(16)31154-0 [pii] 10.1016/j.cell.2016.08.057 [doi].
70. Christian, S., Merz, C., Evans, L., Gradl, S., Seidel, H., Friberg, A., Eheim, A., Lejeune, P., Brzezinka, K., Zimmermann, K., et al. (2019). The novel dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) inhibitor BAY 2402234 triggers differentiation and is effective in the treatment of myeloid malignancies. *Leukemia* 33, 2403–2415. 10.1038/s41375-019-0461-5.
71. Zhang, J., Pavlova, N.N., and Thompson, C.B. (2017). Cancer cell metabolism: the essential role of the nonessential amino acid, glutamine. *EMBO J* 36, 1302–1315. 10.15252/emboj.201696151.
72. Tabe, Y., Lorenzi, P.L., and Konopleva, M. (2019). Amino acid metabolism in hematologic malignancies and the era of targeted therapy. *Blood* 134, 1014–1023. 10.1182/blood.2019001034.
73. Stuani, L., Sabatier, M., and Sarry, J.-E. (2019). Exploiting metabolic vulnerabilities for personalized therapy in acute myeloid leukemia. *BMC Biol* 17, 57. 10.1186/s12915-019-0670-4.
74. Ni, F., Yu, W.-M., Li, Z., Graham, D.K., Jin, L., Kang, S., Rossi, M.R., Li, S., Broxmeyer, H.E., and Qu, C.-K. (2019). Critical role of ASCT2-mediated amino acid metabolism in promoting leukaemia development and progression. *Nat Metab* 1, 390–403. 10.1038/s42255-019-0039-6.
75. Nicklin, P., Bergman, P., Zhang, B., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., Yang, H., Hild, M., Kung, C., Wilson, C., et al. (2009). Bidirectional Transport of Amino Acids Regulates mTOR and Autophagy. *Cell* 136, 521–534. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.044>.
76. Cano-Crespo, S., Chillarón, J., Junza, A., Fernández-Miranda, G., García, J., Polte, C., R. de la Ballina, L., Ignatova, Z., Yanes, Ó., Zorzano, A., et al. (2019). CD98hc (SLC3A2) sustains amino acid and nucleotide availability for cell cycle progression. *Sci Rep* 9, 14065. 10.1038/s41598-019-50547-9.
77. Bajaj, J., Konuma, T., Lytle, N.K., Kwon, H.Y., Ablack, J.N., Cantor, J.M., Rizzieri, D., Chuah, C., Oehler, V.G., Broome, E.H., et al. (2016). CD98-Mediated Adhesive Signaling Enables the Establishment and Propagation of Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Cell* 30, 792–805. 10.1016/j.ccell.2016.10.003.
78. Ananieva, E.A., and Wilkinson, A.C. (2018). Branched-chain amino acid metabolism in cancer: Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care 21, 64–70. 10.1097/MCO.0000000000000430.
79. Thewes, V., Simon, R., Hlevnjak, M., Schlotter, M., Schroeter, P., Schmidt, K., Wu, Y., Anzeneder, T., Wang, W., Windisch, P., et al. (2017). The branched-chain amino acid transaminase 1 sustains growth of antiestrogen-resistant and ER $\alpha$ -negative breast cancer. *Oncogene* 36, 4124–4134. 10.1038/onc.2017.32.

80. Jones, C.L., Stevens, B.M., D'Alessandro, A., Reisz, J.A., Culp-Hill, R., Nemkov, T., Pei, S., Khan, N., Adane, B., Ye, H., et al. (2018). Inhibition of Amino Acid Metabolism Selectively Targets Human Leukemia Stem Cells. *Cancer Cell* *34*, 724-740.e4. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.10.005>.
81. DiNardo, C.D., Pratz, K.W., Letai, A., Jonas, B.A., Wei, A.H., Thirman, M., Arellano, M., Frattini, M.G., Kantarjian, H., Popovic, R., et al. (2018). Safety and preliminary efficacy of venetoclax with decitabine or azacitidine in elderly patients with previously untreated acute myeloid leukaemia: a non-randomised, open-label, phase 1b study. *The Lancet Oncology* *19*, 216–228. 10.1016/S1470-2045(18)30010-X.
82. Pollyea, D.A., Stevens, B.M., Jones, C.L., Winters, A., Pei, S., Minhajuddin, M., D'Alessandro, A., Culp-Hill, R., Riemondy, K.A., Gillen, A.E., et al. (2018). Venetoclax with azacitidine disrupts energy metabolism and targets leukemia stem cells in patients with acute myeloid leukemia. *Nat Med* *24*, 1859–1866. 10.1038/s41591-018-0233-1.
83. Papathanassiou, A.E., Ko, J.-H., Imprialou, M., Bagnati, M., Srivastava, P.K., Vu, H.A., Cucchi, D., McAdoo, S.P., Ananieva, E.A., Mauro, C., et al. (2017). BCAT1 controls metabolic reprogramming in activated human macrophages and is associated with inflammatory diseases. *Nat Commun* *8*, 16040. 10.1038/ncomms16040.
84. Hitzerd, S.M., Verbrugge, S.E., Ossenkoppele, G., Jansen, G., and Peters, G.J. (2014). Positioning of aminopeptidase inhibitors in next generation cancer therapy. *Amino Acids* *46*, 793–808. 10.1007/s00726-013-1648-0.
85. Corces-Zimmerman, M.R., Hong, W.J., Weissman, I.L., Medeiros, B.C., and Majeti, R. (2014). Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, 2548–2553. 1324297111 [pii] 10.1073/pnas.1324297111 [doi].
86. Shlush, L.I., Zandi, S., Mitchell, A., Chen, W.C., Brandwein, J.M., Gupta, V., Kennedy, J.A., Schimmer, A.D., Schuh, A.C., Yee, K.W., et al. (2014). Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature* *506*, 328–333. nature13038 [pii] 10.1038/nature13038 [doi].
87. Shlush, L.I., Mitchell, A., Heisler, L., Abelson, S., Ng, S.W.K., Trotman-Grant, A., Medeiros, J.J.F., Rao-Bhatia, A., Jaciw-Zurakowsky, I., Marke, R., et al. (2017). Tracing the origins of relapse in acute myeloid leukaemia to stem cells. *Nature* *547*, 104–108. 10.1038/nature22993.
88. Abelson, S., Collord, G., Ng, S.W.K., Weissbrod, O., Mendelson Cohen, N., Niemeyer, E., Barda, N., Zuzarte, P.C., Heisler, L., Sundaravadanam, Y., et al. (2018). Prediction of acute myeloid leukaemia risk in healthy individuals. *Nature* *559*, 400–404. 10.1038/s41586-018-0317-6.
89. Taya, Y., Ota, Y., Wilkinson, A.C., Kanazawa, A., Watarai, H., Kasai, M., Nakauchi, H., and Yamazaki, S. (2016). Depleting dietary valine permits nonmyeloablative mouse hematopoietic stem cell transplantation. *Science* *354*, 1152–1155. 10.1126/science.aag3145.
90. Sinclair, L.V., Rolf, J., Emslie, E., Shi, Y.-B., Taylor, P.M., and Cantrell, D.A. (2013). Control of amino-acid transport by antigen receptors coordinates the metabolic reprogramming essential for T cell differentiation. *Nat Immunol* *14*, 500–508. 10.1038/ni.2556.
91. Liu, X., Zhang, F., Zhang, Y., Li, X., Chen, C., Zhou, M., Yu, Z., Liu, Y., Zhao, Y., Hao, X., et al. (2018). PPM1K Regulates Hematopoiesis and Leukemogenesis through CDC20-Mediated Ubiquitination of MEIS1 and p21. *Cell Reports* *23*, 1461–1475. 10.1016/j.celrep.2018.03.140.
92. Shlush, L.I. (2018). Age-related clonal hematopoiesis. *Blood* *131*, 496.
93. Wiseman, D.H., Williams, E.L., Wilks, D.P., Sun Leong, H., Somerville, T.D., Dennis, M.W., Struys, E.A., Bakkali, A., Salomons, G.S., and Somervaille, T.C. (2016). Frequent

- reconstitution of IDH2(R140Q) mutant clonal multilineage hematopoiesis following chemotherapy for acute myeloid leukemia. *Leukemia* 30, 1946–1950. leu201693 [pii] 10.1038/leu.2016.93 [doi].
94. Poinsignon, V., Mercier, L., Nakabayashi, K., David, M.D., Lalli, A., Penard-Lacronique, V., Quivoron, C., Saada, V., De Botton, S., Broutin, S., et al. (2016). Quantitation of isocitrate dehydrogenase (IDH)-induced D and L enantiomers of 2-hydroxyglutaric acid in biological fluids by a fully validated liquid tandem mass spectrometry method, suitable for clinical applications. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1022, 290–297. S1570-0232(16)30249-5 [pii] 10.1016/j.jchromb.2016.04.030 [doi].
95. Tiberi, G., Pekowska, A., Oudin, C., Ivey, A., Autret, A., Prebet, T., Koubi, M., Lembo, F., Mozziconacci, M.-J., Bidaut, G., et al. (2015). PcG methylation of the HIST1 cluster defines an epigenetic marker of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 29, 1202–1206. 10.1038/leu.2014.339.
96. Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet j.* 17, 10. 10.14806/ej.17.1.200.
97. Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21. 10.1093/bioinformatics/bts635.
98. Anders, S., Pyl, P.T., and Huber, W. (2015). HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31, 166–169. 10.1093/bioinformatics/btu638.
99. Anders, S., and Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 11, R106. 10.1186/gb-2010-11-10-r106.
100. Bray, N.L., Pimentel, H., Melsted, P., and Pachter, L. (2016). Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol* 34, 525–527. 10.1038/nbt.3519.
101. Sonesson, C., Love, M.I., and Robinson, M.D. (2016). Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences. *F1000Res* 4, 1521. 10.12688/f1000research.7563.2.
102. Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550. 10.1186/s13059-014-0550-8.
103. Korotkevich, G., Sukhov, V., Budin, N., Shpak, B., Artyomov, M.N., and Sergushichev, A. (2016). Fast gene set enrichment analysis (Bioinformatics) 10.1101/060012.
104. Kanehisa, M. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research* 28, 27–30. 10.1093/nar/28.1.27.
105. Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., et al. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 15545–15550. 10.1073/pnas.0506580102.
106. Liberzon, A., Subramanian, A., Pinchback, R., Thorvaldsdottir, H., Tamayo, P., and Mesirov, J.P. (2011). Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. *Bioinformatics* 27, 1739–1740. 10.1093/bioinformatics/btr260.
107. The Gene Ontology Consortium, Carbon, S., Douglass, E., Good, B.M., Unni, D.R., Harris, N.L., Mungall, C.J., Basu, S., Chisholm, R.L., Dodson, R.J., et al. (2021). The Gene Ontology resource: enriching a Gold mine. *Nucleic Acids Research* 49, D325–D334. 10.1093/nar/gkaa1113.
108. Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., et al. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet* 25, 25–29. 10.1038/75556.
109. Han, H., Cho, J.-W., Lee, S., Yun, A., Kim, H., Bae, D., Yang, S., Kim, C.Y., Lee, M.,

- Kim, E., et al. (2018). TRRUST v2: an expanded reference database of human and mouse transcriptional regulatory interactions. *Nucleic Acids Research* 46, D380–D386. 10.1093/nar/gkx1013.
110. Xie, Z., Bailey, A., Kuleshov, M.V., Clarke, D.J.B., Evangelista, J.E., Jenkins, S.L., Lachmann, A., Wojciechowicz, M.L., Kropiwnicki, E., Jagodnik, K.M., et al. (2021). Gene Set Knowledge Discovery with Enrichr. *Current Protocols* 1. 10.1002/cpz1.90.
111. Cancer Genome Atlas Research Network, Ley, T.J., Miller, C., Ding, L., Raphael, B.J., Mungall, A.J., Robertson, A.G., Hoadley, K., Triche, T.J., Laird, P.W., et al. (2013). Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 368, 2059–2074. 10.1056/NEJMoa1301689.
112. Tyner, J.W., Togonon, C.E., Bottomly, D., Wilmot, B., Kurtz, S.E., Savage, S.L., Long, N., Schultz, A.R., Traer, E., Abel, M., et al. (2018). Functional genomic landscape of acute myeloid leukaemia. *Nature* 562, 526–531. 10.1038/s41586-018-0623-z.



**A****B****C**

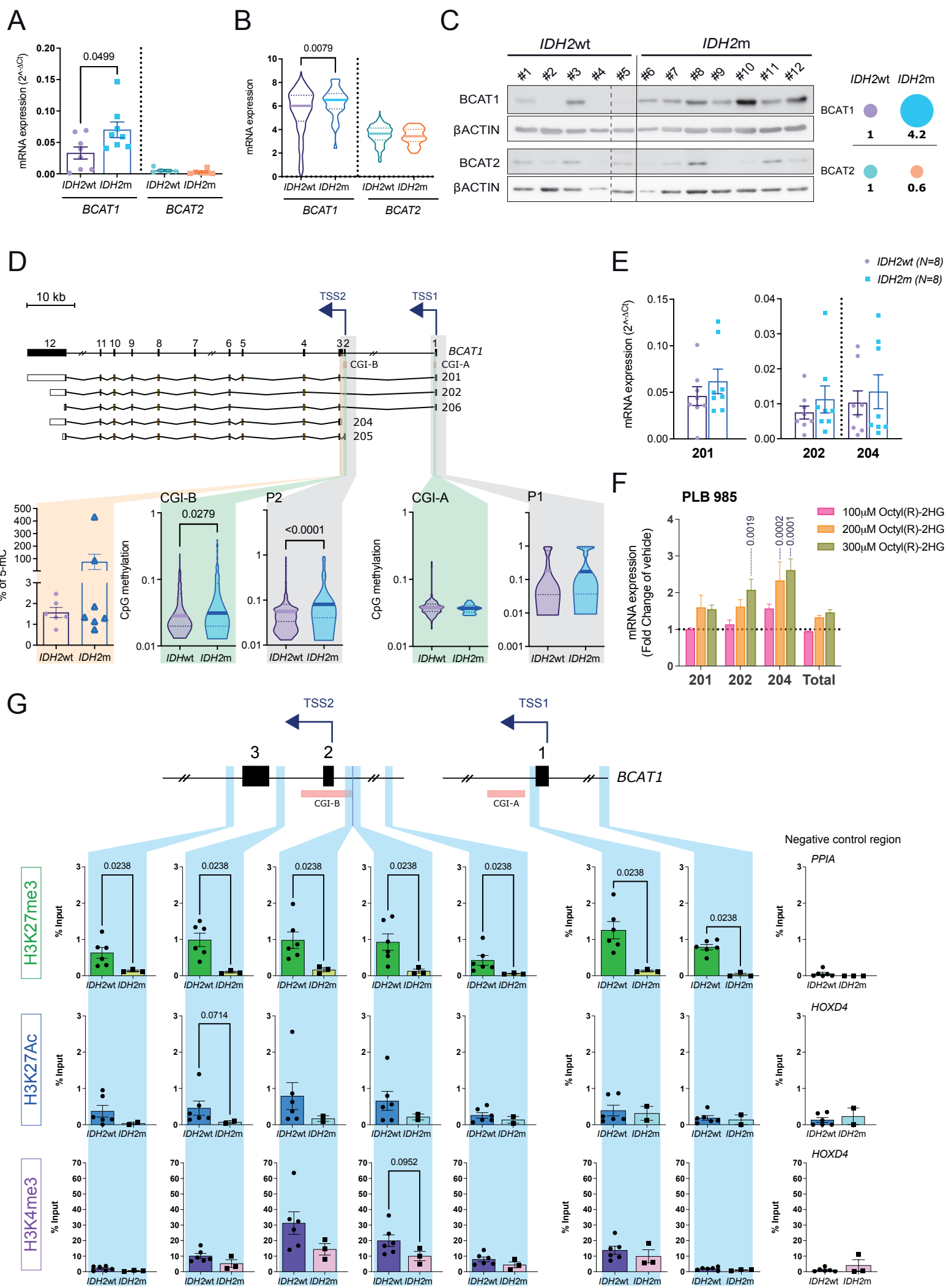
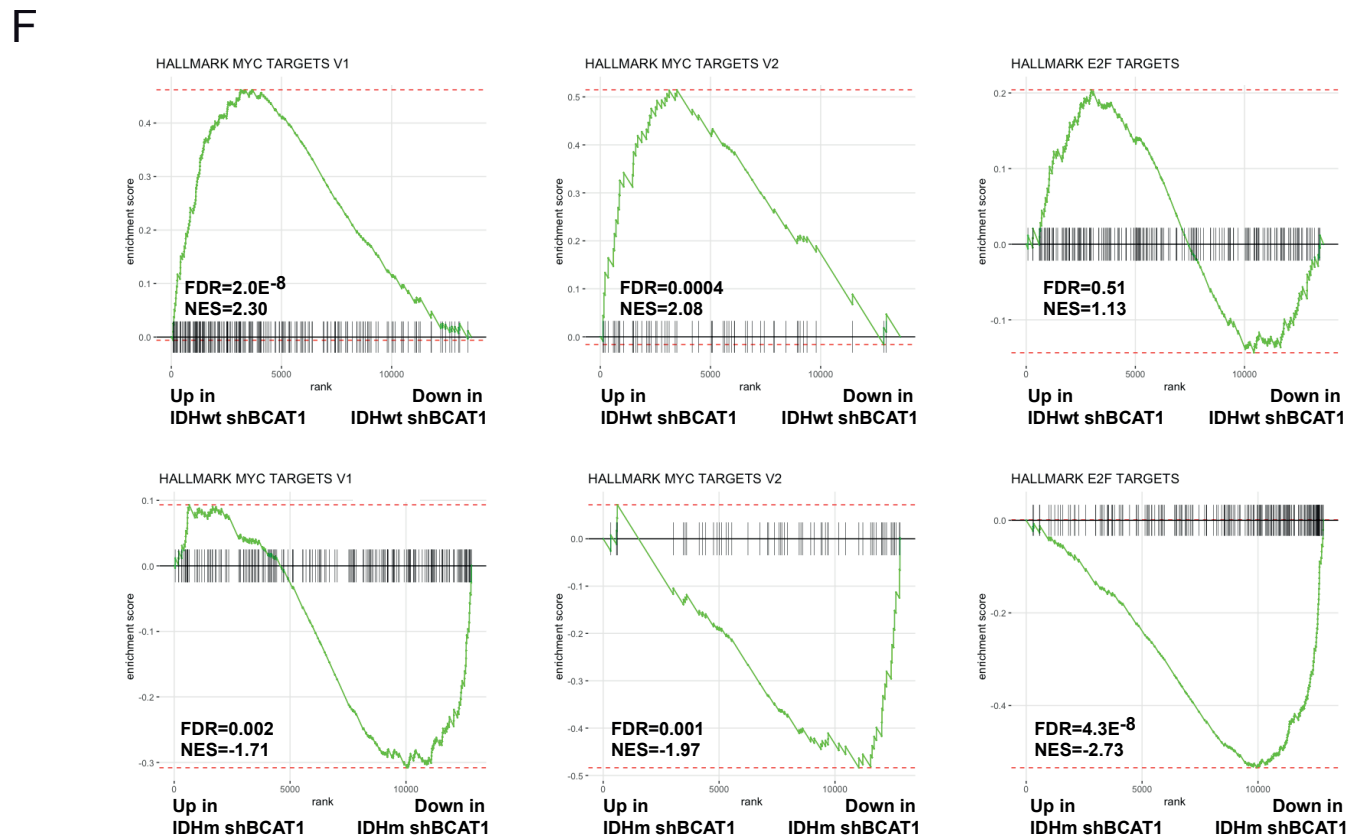
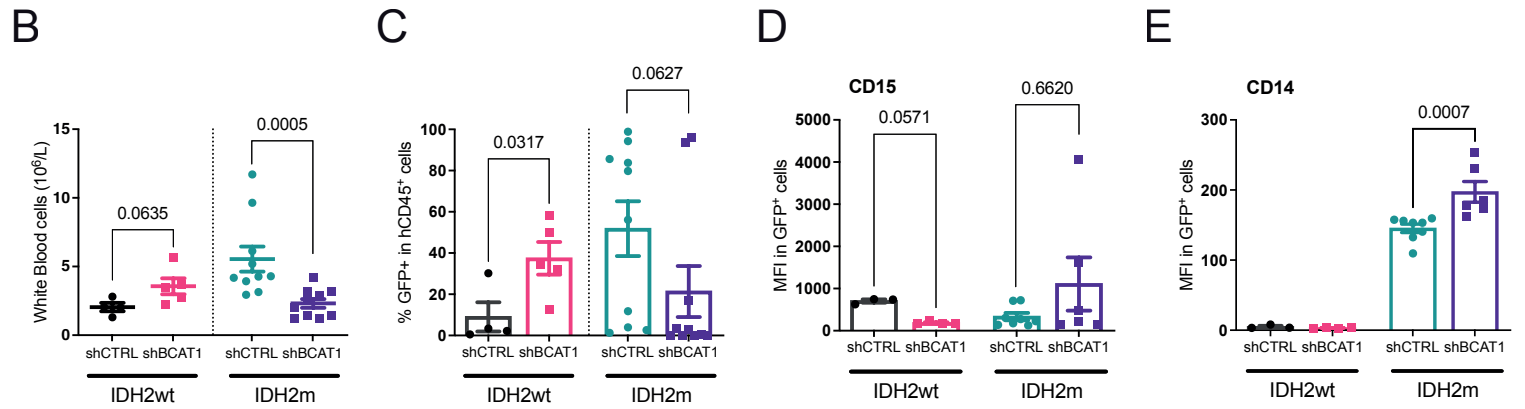
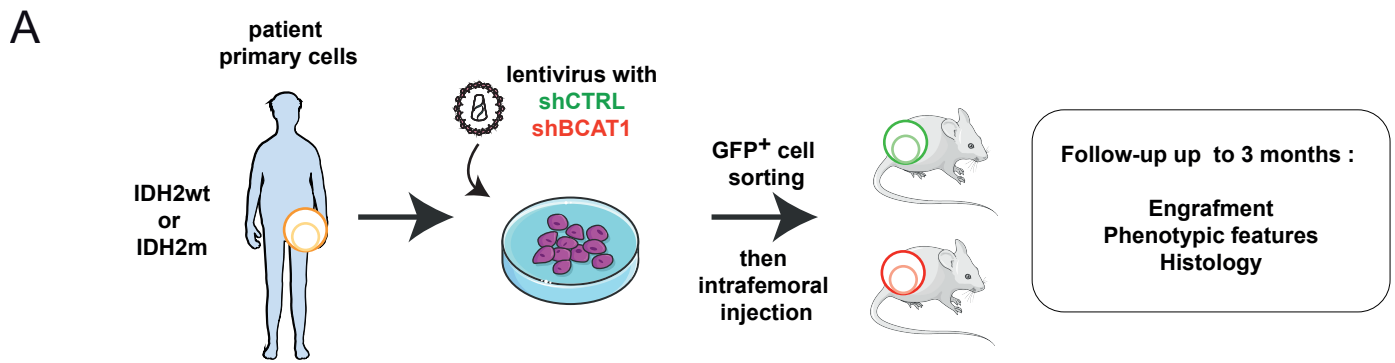


Fig2



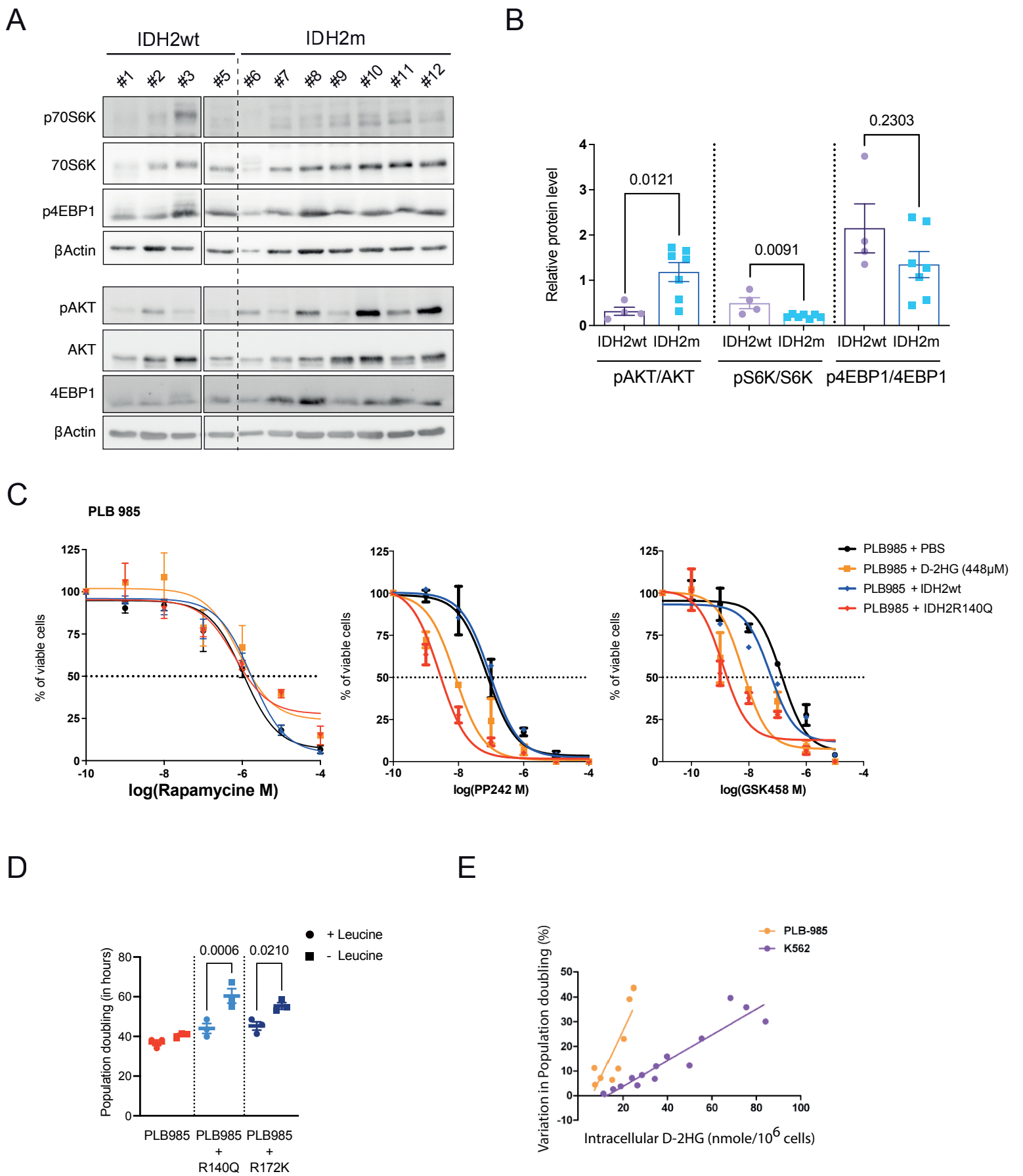
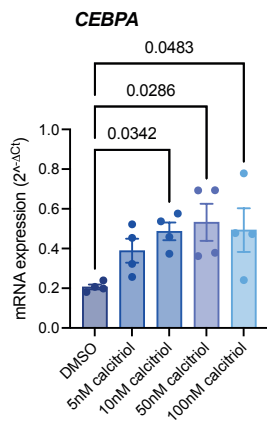
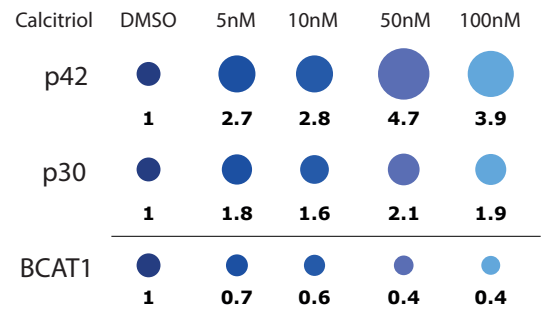
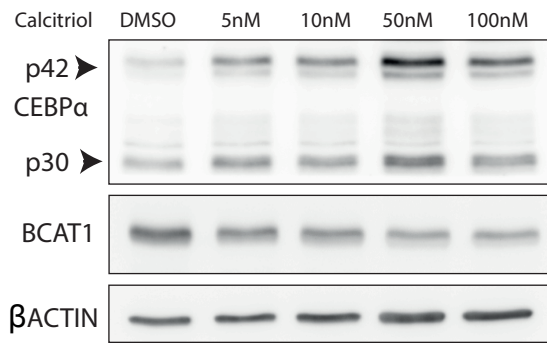
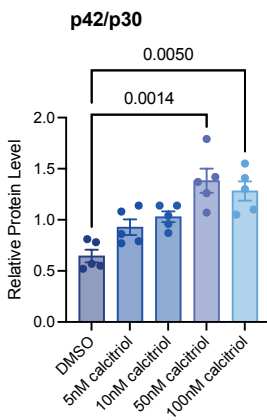
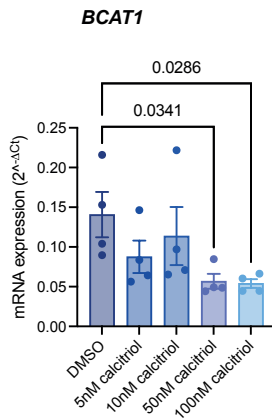
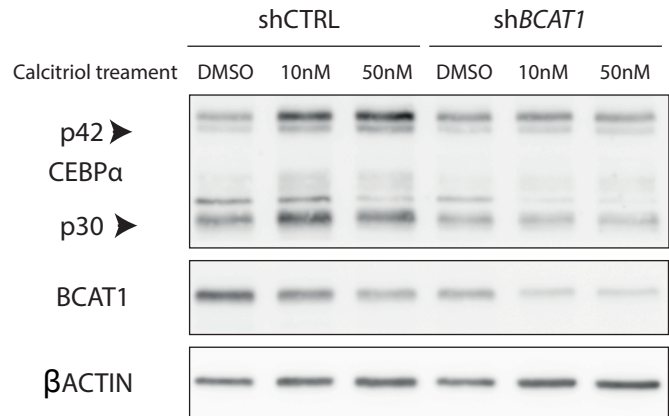
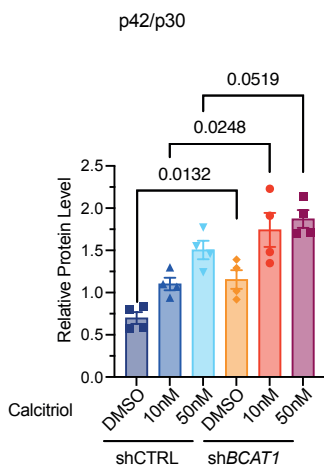
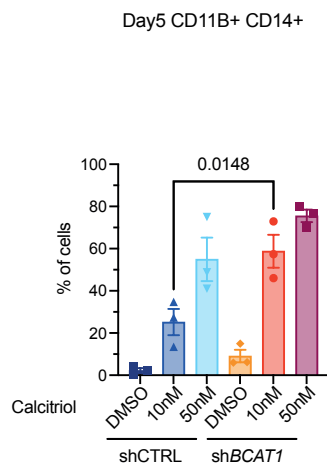
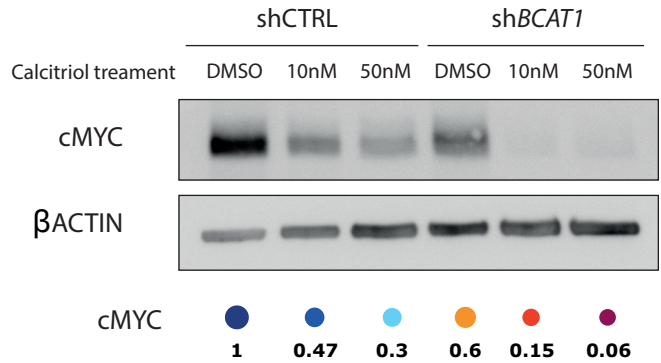
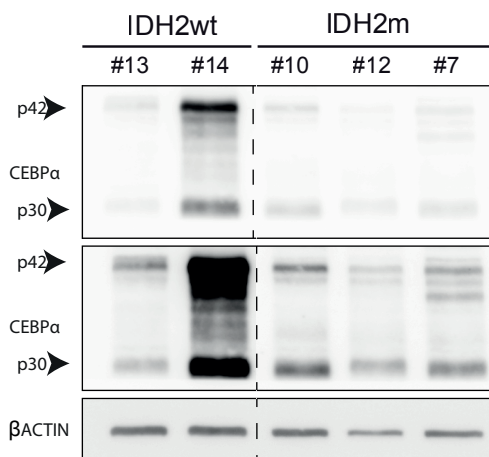
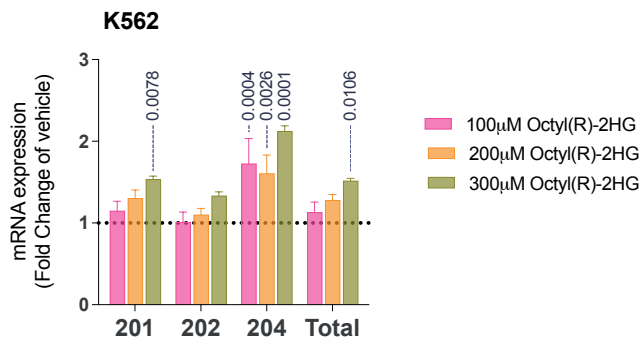
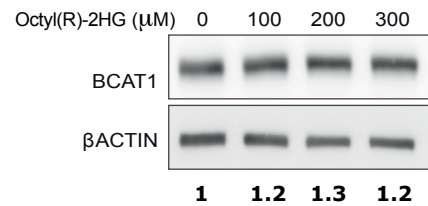
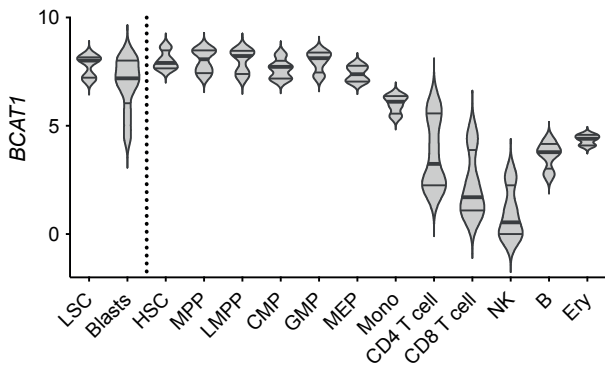
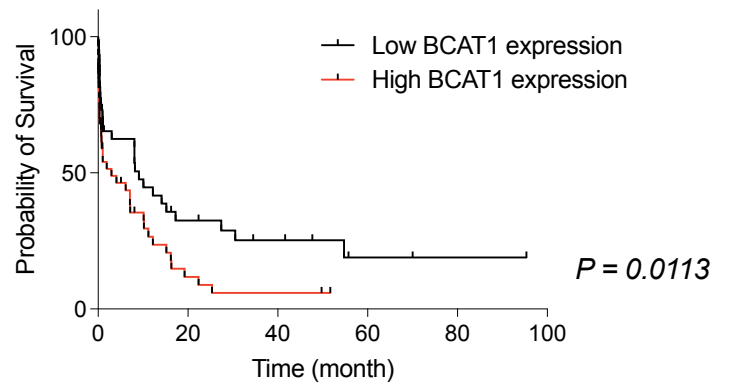
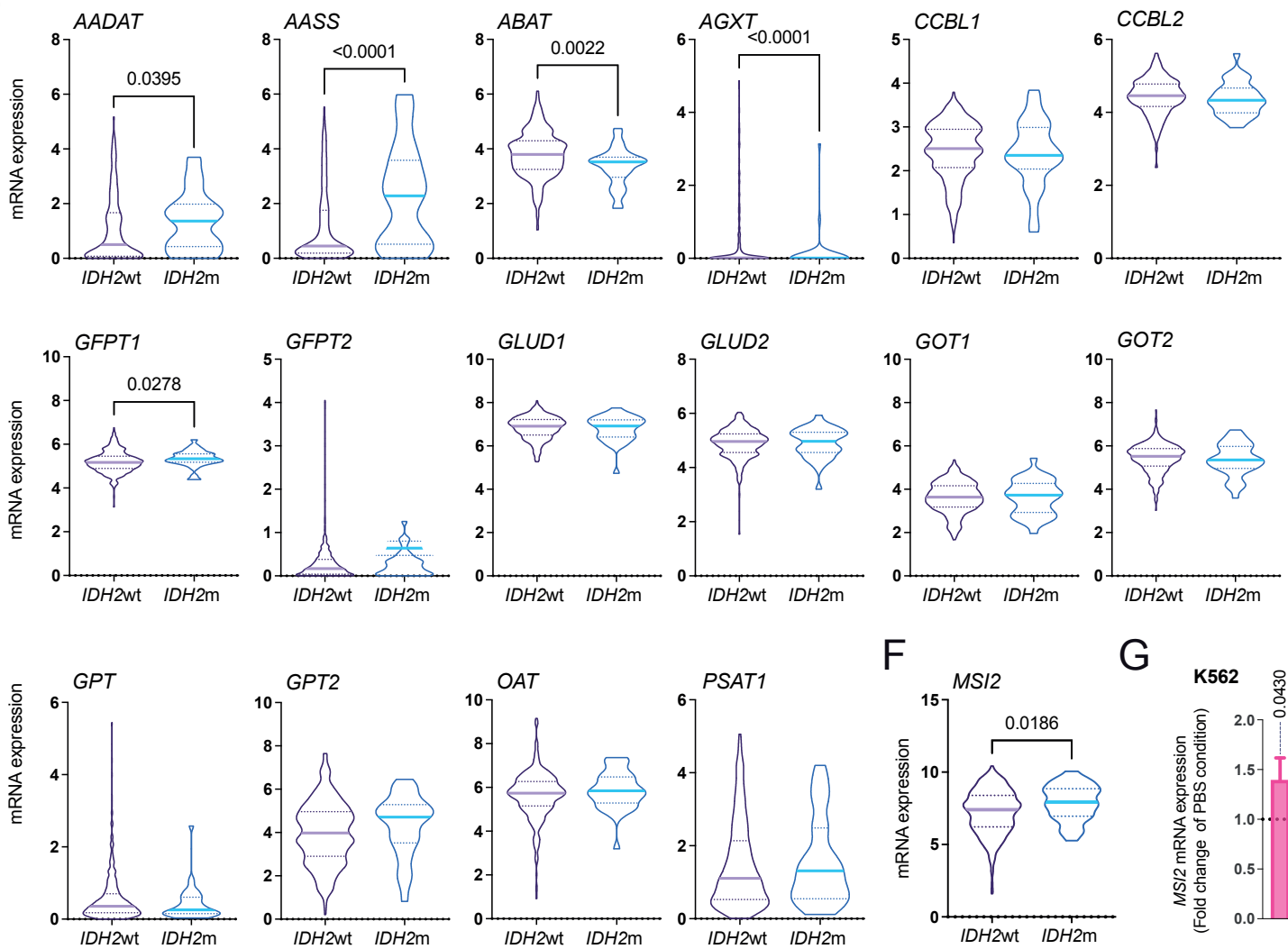
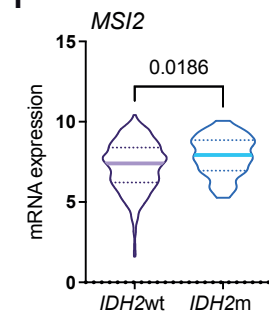
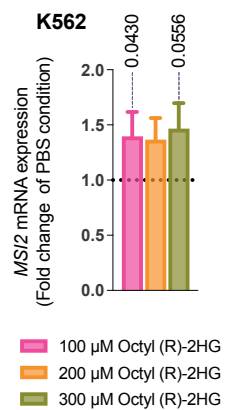
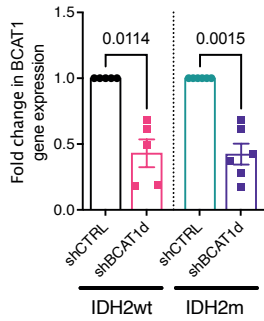


Fig4

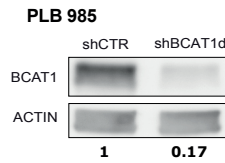
**A****B****C****D****E****F****G****H****I**

**A****B****C****D****E****F****G**

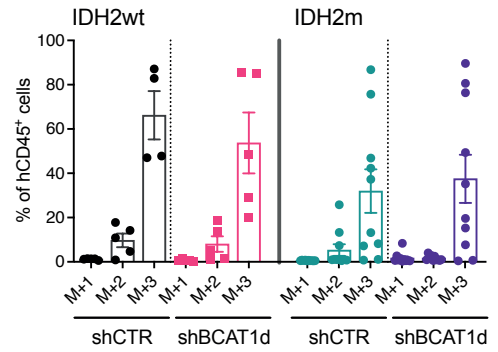
A



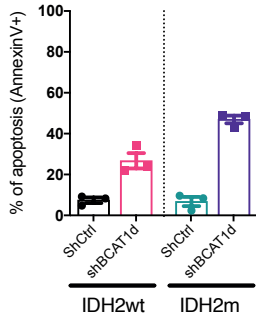
B



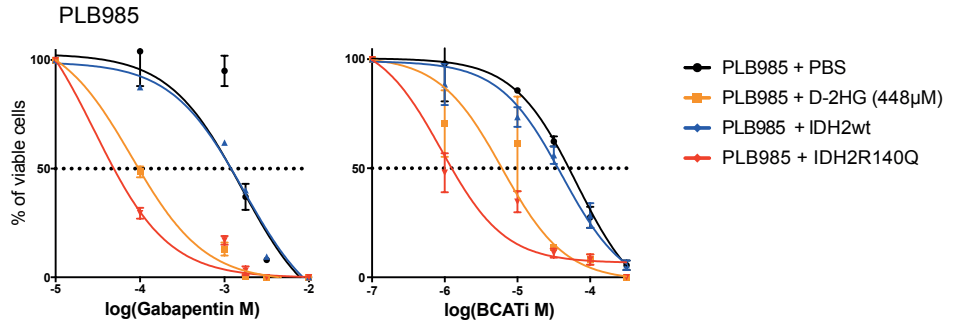
C



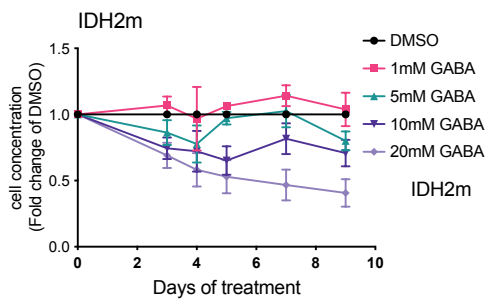
D



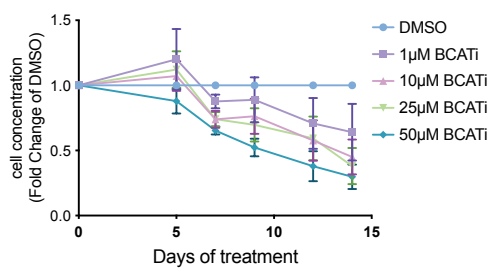
E



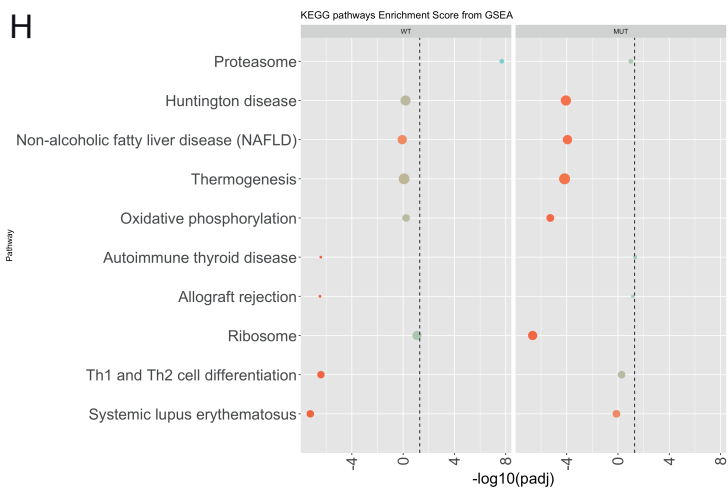
F



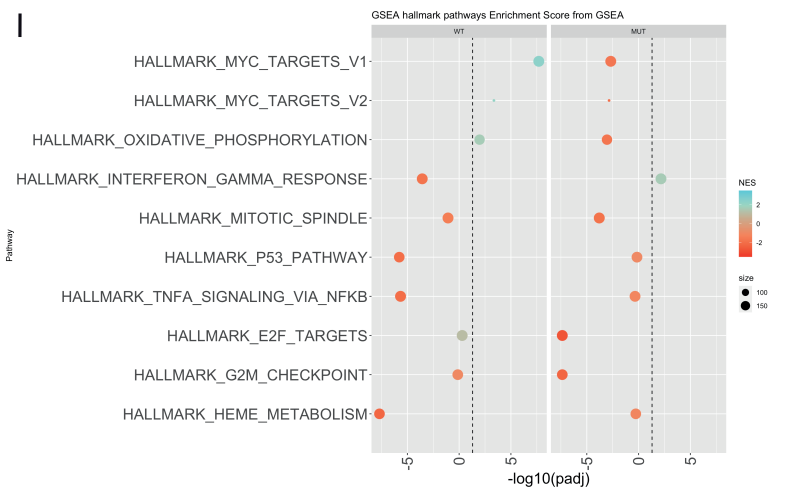
G



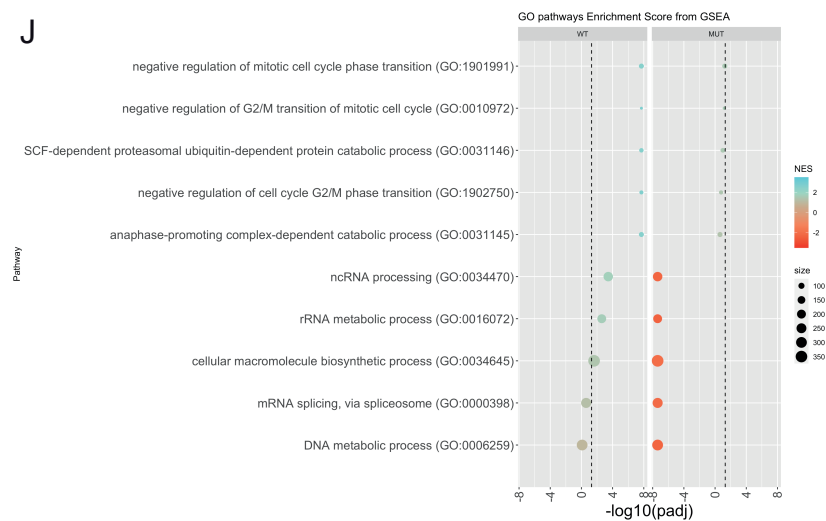
H

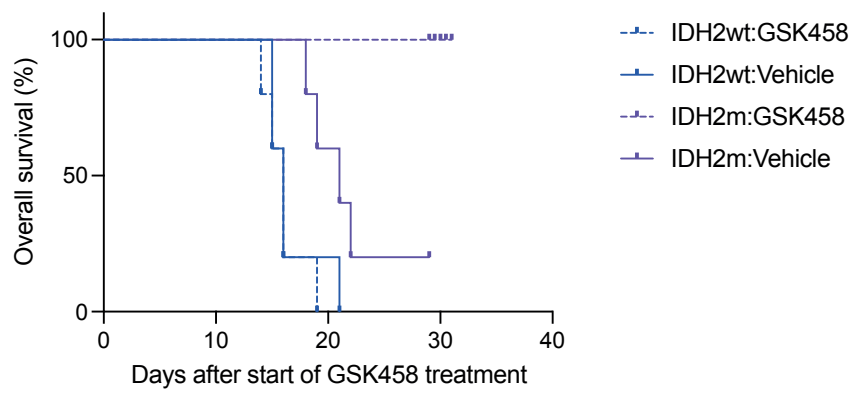
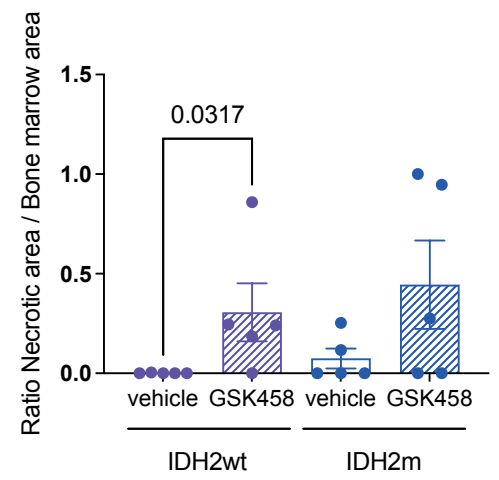
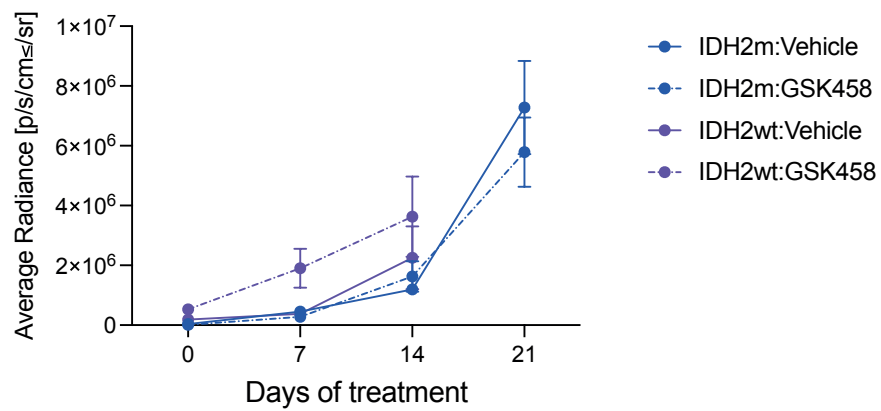


I

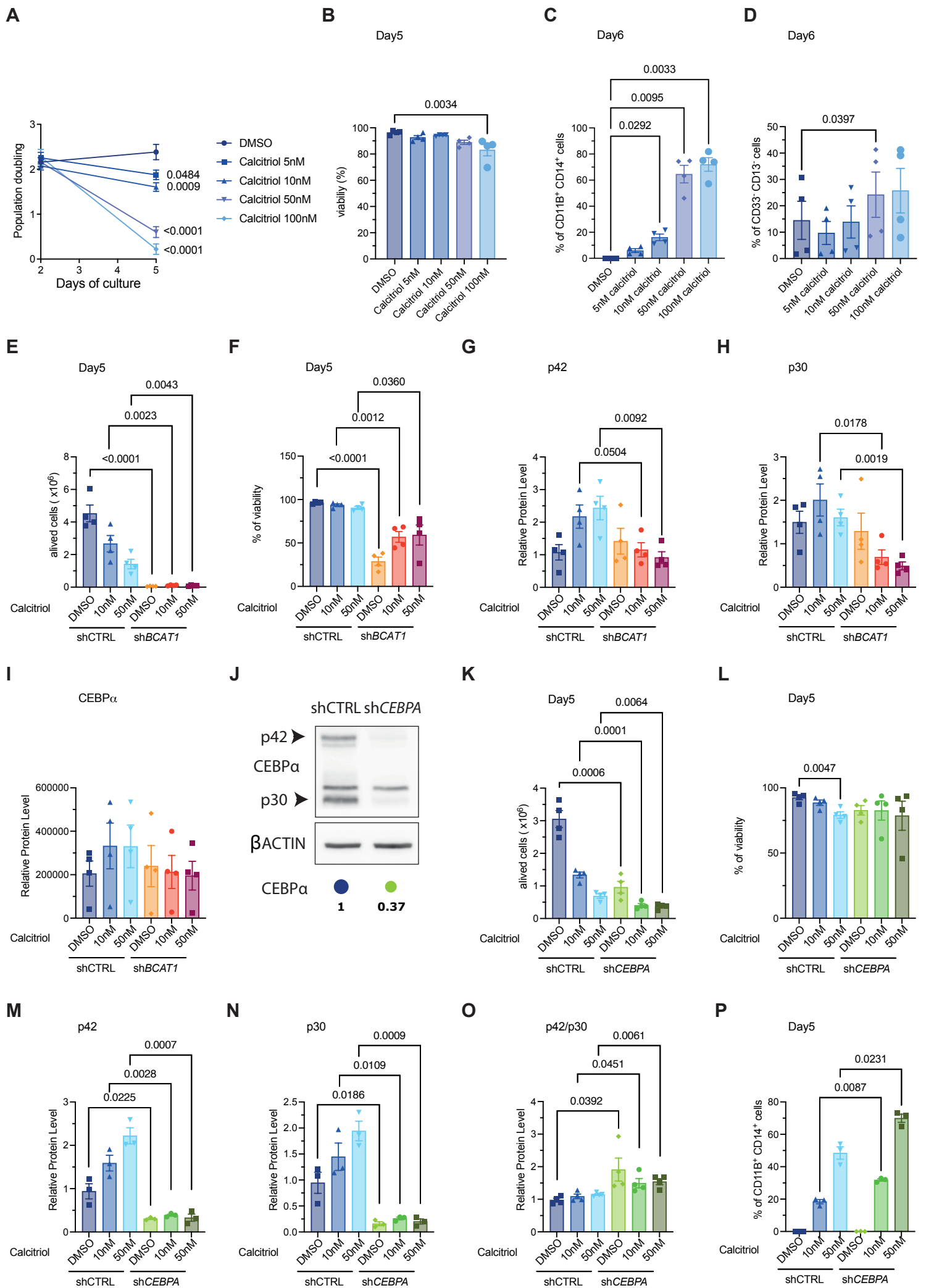


J



**A****B****C**





## LEGENDS

### Figure 1 : Fate of leucine and $\alpha$ KIC in mutant and wild-type IDH2 AML bulks

A-B) BCAA- (A) and BCKA- (B) tracing experiments. Data were normalized to succinate values as internal control. P-value was assessed by two-sided, unpaired t-test. C)  $\alpha$ KIC levels in IDH2 wildtype (N= 10) and mutant (N= 21) AML samples. p-value was assessed by two-sided, unpaired t-test.

### Figure 2 : Expression and methylation status of the human BCAT1 locus in human primary AML cells.

A) Bar plots comparing mean mRNA expression level of *BCAT1* (left) and *BCAT2* (right) genes normalized by *PPIA* expression across *IDH2* wildtype and mutant AML samples (*BCAT1* : N=8 for each genotypes ; *BCAT2* : N=5 for each genotypes). Non-parametric Mann-Whitney *p* values are shown. B) Violin plots of *BCAT1* (left) and *BCAT2* (right) gene expression across *IDH2* wildtype and mutant AML samples (N=374 and N=34, respectively, Beat AML dataset). Statistical testing was performed with ordinary one-way ANOVA. C) Western blot analysis of *BCAT1* and *BCAT2* protein levels in primary *IDH2* wildtype and mutant AML cells.  $\beta$ ACTIN served as loading control. Fold changes in protein expression levels were calculated relative to *IDH2* wildtype AML samples. D) Upper panel : Schematic representation of the endogenous human *BCAT1* locus. Alternative promoters P1 and P2, and high-density CpG regions (CGI-A and CGI-B) are shown. Promoters are defined as regions spanning from -2 KB to +1 KB around the corresponding transcriptional start site, TSS. Transcripts initiated from P1 or P2 are indicated. Lower panels : Methylation status of the locus *BCAT1* in *IDH2m* and *IDH2wt* blasts. From left to right : The Orange panel represents the % of 5methylcytosine at P2 in the two genetic contexts *IDHwt* samples, N=5; *IDHm* AML samples, N=7). Values represent the mean  $\pm$  SEM. The green panels represent the methylation pattern of cytosines at CpG sites in CGI-B (left) and CGI-A (right) in *IDH2wt* and *IDH2m* AML samples obtained from the TCGA database (N=138 and N=16, respectively). Violin plots represent median  $\pm$  SEM and p-value was assessed with Welch's t test. The grey panels represent the methylation pattern of cytosines at CpG sites in promoter P1 and P2 across *IDH2* wildtype and mutant AML samples (N=138 and N=16, respectively, TCGA database). E) Expression of *BCAT1* transcripts initiated at P1 (201) or P2 (202, 204) in primary *IDH2m* (N=8) and *IDH2wt* (N=8) blasts. Expressions were normalized on *PPIA* level. F) Expression of total *BCAT1* transcripts (total) or initiated at P1 (201) or P2 (202, 204) in PLB-985 cell line following 3-day exposure to increasing doses of (2R)-Octyl- $\alpha$ -hydroxyglutarate ester (Octyl(R)-2HG). Expression was measured relative to the expression of the reference gene *PPI2A*. Values represent the mean  $\pm$  SEM. p-value was assessed by a 2way ANOVA test. G) ChIP-qPCR using antibodies against H3K27me3 (upper panel), H3K27ac (middle panel) and H3K4me3 (lower panel) were performed at regions around TSS1 and TSS2 in *IDH2wt* (N=6) and *IDH2m* (N=3) AML samples. Enrichments are expressed as percentage of input (% of input). Values represent the mean  $\pm$  SEM and p-value was assessed with non-parametric Mann-Withney test.

### Figure 3 : BCAT1 inhibition reduces growth and promote partial differentiation of *IDH2m* AML cells

A) Establishment of PDXs. AML cells carrying *IDH2* wild type or *IDH2* mutant are collected from the blood or the bone marrow of patients. Cells are then transduced with lentiviruses expressing either shCTRL or shBCAT1. Transduced GFP+ cells were FACS-sorted and transplanted by intrafemoral injection in immunosuppressed mice (N=5 recipients for *IDH2wt*

cells or N=10 recipients for IDH2m cells). Mice were followed up to 3 months and then sacrificed. Engraftment and immunophenotype of blood or bone marrow cells were assessed every month. B) White blood cells counts at sacrifice. Values represent the mean  $\pm$  SEM and p-values were assessed with non-parametric Mann-Whitney test. Each data point represents a recipient. C) Frequency of GFP positive cells in human CD45<sup>+</sup> cells in bone marrow of engrafted mice. D) Median Fluorescence Intensity (MFI) of CD15 in GFP<sup>+</sup> cells in bone marrow of engrafted mice. E) Median Fluorescence Intensity (MFI) of CD14 in GFP<sup>+</sup> cells in bone marrow of engrafted mice. F) GSEA analyses upon BCAT1 invalidation in primary AML *IDH2wt* (N=3) and *IDH2m* (N=3) cells. Myc targets and E2F targets signature enrichment plots upon BCAT1 knockdown in IDH2 wildtype (upper panels, N=3) or mutant (lower panels, N=3) AML cells.

#### **Figure 4 : BCAT1 functions are associated with mTORC1 activities in *IDH2m* AML cells**

A) Western blot analysis revealing expression levels of effectors of mTORC1 (4EBP1 and S6K) and mTORC2 (AKT) in human *IDH2wt* (N=4) and *IDH2m* (N=7) AML cells. B) Relative protein level quantification is shown as mean  $\pm$  SEM. p-values were assessed with non-parametric Mann-Whitney test. C) IC<sub>50</sub> of Rapamycin (left panel), PP242 (middle panel), GSK458 (right panel) determined in PLB-985 cell line transduced with lentivirus expressing either IDH2R140Q or IDH2 wildtype, or exposed to either (2R)-Octyl- $\alpha$ -hydroxyglutarate or PBS. Cell viability was assessed by trypan blue exclusion after 3 days. Values were represented with SEM. D) Population doubling of PLB-985 cell line alone or transduced with lentivirus expressing either IDH2R140Q or IDH2R172K. Cells were incubated in control (+ Leucine) or leucine-deficient (- Leucine) medium for 6 days. Values represent the mean  $\pm$  SEM. p-values were assessed with ordinary one-way ANOVA test.

#### **Figure 5 : BCAT1 invalidation promotes myeloid differentiation in a CEBPA-dependent manner**

A) mRNA quantification of *CEBPA* assessed by RT-qPCR in PLB-985 cells exposed to increasing doses of calcitriol for 5 days. Expression was normalized on *PPIA* mRNA level. p-values were generated with Kruskal-Wallis tests (4 independent experiments). B) Western blot analysis of BCAT1 and CEBP $\alpha$  (p30 and 42 isoforms) protein levels in PLB-985 cells exposed to increasing doses of calcitriol for 5 days. Fold changes in protein expression levels were calculated relative to DMSO-treated condition. C) Quantification of the p42/p30 isoforms ratio in PLB-985 cells exposed to increasing doses of calcitriol for 5 days. Values were calculated with Kruskal-Wallis tests (4 independent experiments). D) mRNA quantification of *BCAT1* assessed by RT-qPCR in PLB-985 cells exposed to increasing doses of calcitriol for 5 days. Expression was normalized on *PPIA* mRNA level. p-values were calculated with Kruskal-Wallis tests (4 independent experiments). E) Western blot analysis of BCAT1, CEBP $\alpha$  isoforms (p30 and 42) protein levels in PLB-985 cells transduced with lentiviruses expressing shCTRL or shBCAT1 and exposed to increasing doses of calcitriol for 5 days. F) Quantification of the p42/p30 isoforms ratio in the different experimental conditions. Values were calculated with Kruskal-Wallis tests (4 independent experiments). G) Frequency of differentiated CD11<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> cells in PLB-985 cells transduced with lentiviruses expressing shCTRL or shBCAT1 and exposed to increasing doses of calcitriol for 5 days. p-value were assessed with RM one-way ANOVA test (4 independent experiments). H) Western blot analysis of cMYC protein levels in PLB-985 cells transduced with lentiviruses expressing shCTRL or shBCAT1 and exposed to increasing doses of calcitriol for 5 days. Fold changes in protein expression levels were calculated relative to DMSO-treated shCTRL condition. I) Western blot analysis of CEBP $\alpha$  isoforms in primary *IDH2wt* and *IDH2m* AML cells.  $\beta$ ACTION served as loading control.

## Extended Figure 2 : Expression of $\alpha$ KG-dependent transaminases and *MSI2* in human primary AML cells.

A) mRNA expression of *BCAT1* total and *201*, *202* and *204* transcripts in K562 cell line following 3-day exposure to increasing doses of (2R)-Octyl- $\alpha$ -hydroxyglutarate ester (Octyl(R)-2HG). Expressions were normalized on *PPIA* gene. Values represent the mean  $\pm$  SEM and p-value was assessed by a 2way ANOVA test. B) Western blot analysis of *BCAT1* protein levels in K562 cell line following 3-day exposure to increasing doses of Octyl(R)-2HG.  $\beta$ ACTIN served as loading control. Fold changes in protein expression levels were calculated relative to PBS-treated condition. C) *BCAT1* mRNA expression measured by unstranded RNA sequencing across 13 normal hematopoietic cell types (GSE74246 dataset). LSC = Leukemic Stem Cell, HSC = Hematopoietic Stem Cell, MPP = Multipotent Progenitor, LMPP = Lymphoid-Myeloid Primed Progenitor, CMP = Common Myeloid Progenitor, GMP = Granulocyte Monocyte Progenitor, MEP = Megakaryocyte Erythrocyte Progenitor, Mono = Monocyte, NK = Natural Killer, B = B lymphoid cell, Ery = Erythrocyte. D) Overall survival curve of AML patients with high and low *BCAT1* expression from OHSU Beat-AML database (Mantel-Cox log-rank test and a hazard-ratio, Log-rank test). E-F) Violin plots of  $\alpha$ KG-dependent transaminases (E) and *MSI2* (F) gene expression across *IDH2wt* and *IDH2m* AML samples (N=374 and N=34, respectively, Beat AML dataset). Statistical testing was performed with non-parametric Mann-Whitney test. G) Quantification of *MSI2* mRNA in K562 cell line following 3-day exposure to increasing doses of Octyl(R)-2HG. Values represent the mean  $\pm$  SEM and were normalized on *PPIA* gene. p-value was assessed by a paired t test.

## Extended Figure 3 : *BCAT1* inhibition induces apoptosis and reduced cellular proliferation in *IDH2* mutated AML cells

A) *BCAT1* mRNA expression in *IDH2wt* (N=5) and *IDH2m* (N=6) AML cells transduced with lentiviruses expressing either shCTRL or sh*BCAT1*. *BCAT1* mRNA level was normalized on *POL2RA* gene expression. Fold changes in *BCAT1* mRNA expression levels were calculated relative to shCTRL. Values represent the mean  $\pm$  SEM and p-values were assessed with multiple comparisons test. B) Western blot analysis of *BCAT1* protein level in PLB-985 cell line transduced with lentivirus expressing either shCTRL or sh*BCAT1* for 3 days.  $\beta$ ACTIN served as loading control. Fold change in protein expression level were calculated relative to shCTRL condition. C) Frequency of hCD45+ cells in the bone marrow of engrafted mice assessed by Flow cytometry every month after transplantation. Values represent the mean  $\pm$  SEM. Each data point represents a recipient. D) Percentage of Annexin V positive cells in primary *IDH2wt* (N=3) and *IDH2m* (N=3) AML cells 3 days after *in vitro* *BCAT1* invalidation. E)  $IC_{50}$  of Gabapentin (GABA, left panel) and *BCAT* inhibitor (*BCATi*, right panel) determined in PLB-985 cell-line transduced with lentivirus expressing either *IDH2R140Q* or *IDH2* wildtype, or exposed to either Octyl(R)-2HG or PBS. Cell viability was assessed by trypan blue exclusion after 3 days of culture. Values were represented with SEM. F-G) Cell concentration of human *IDH2m* AML cells (N=3) treated with increasing doses of GABA (F) or *BCATi* (G). Fold changes in cell viability were calculated relative to DMSO condition. Values were represented with SEM. H-J) GSEA analysis of differentially expressed genes in *IDH2wt* and *IDH2m* AML cells following *BCAT1* invalidation. Significantly enriched KEGG pathways yielded in at least two comparisons are displayed in bubble plots. The size of the dots represents the number of enriched genes. The X-axis coordinate represents the P-value of enrichment analysis and the color of the dots represents the gene ratio. (H) Top 10 among the most significantly enriched Kyoto Encyclopedia of Genes

and Genomes (KEGG) pathways. (I) Top 10 among the most significantly enriched GSEA Hallmark pathways. (J) Top 10 among the most significantly enriched Gene Ontology (GO) pathways.

#### **Extended Figure 4 : mTOR pathway supports viability of AML cells**

A) *IDH2wt* or *IDH2R140Q* AML cells are transduced with pFUW-Luc-mCherry lentivirus. mCherry positive cells were FACS-sorted and transplanted by intrafemoral injection in immunosuppressed mice (N=5 for each AML genotype). Then, mice received a daily oral gavage of GSK428 (3mg/kg) or vehicle for a month. Engraftment was evaluated every week post-transplantation. B) Representation of necrotic area in bone marrow in engrafted mice assessed by immunohistochemistry. Values represent the mean  $\pm$  SEM and p-values were assessed with non-parametric Mann-Whitney test. C) Quantitative measurement of radiance using *in vivo* imaging (IVIS). Radiance reflects the intensity of luciferase luminescence and therefore number of luciferase-tagged cells present. Values represent the mean  $\pm$  SEM.

#### **Extended Figure 5 : BCAT1 and CEBPA invalidations increase p42/p30 ratio and promote cell differentiation following calcitriol exposure**

A-B) Population doubling (A) and cell viability (B) of PLB-985 cell line exposed to increasing dose of Calcitriol for up to 6 days. p-value was assessed with ordinary one-way ANOVA test (4 independent experiments). C) Frequency of differentiated CD11+/CD14+ cells when PLB-985 cells were exposed to increasing dose of Calcitriol for 6 days. p-value were assessed with RM one-way ANOVA test (4 independent experiments). D) Frequency of CD13-/CD33- cells when PLB-985 cells were exposed to increasing dose of Calcitriol for 6 days. p-value were assessed with RM one-way ANOVA test (4 independent experiments). E-F) Cell proliferation (E) and viability (F) of PLB-985 cell line transduced with lentiviruses expressing either shCTRL or sh*BCAT1* and exposed to increasing dose of Calcitriol for up to 5 days. p-values were assessed with unpaired t test (4 independent experiments). G-I) Protein level quantifications of CEBP $\alpha$  total, p30 and 42 isoforms, in PLB-985 cells transduced with lentiviruses expressing shCTRL or sh*BCAT1* and exposed 5 Days to increasing doses of calcitriol. Expressions were normalized on  $\beta$ ACTIN level. Values were generated with Kruskal-Wallis tests (4 independent experiments). J) Western blot analysis of CEBP $\alpha$  isoforms (p30 and 42) protein levels in PLB-985 cells transduced with lentiviruses expressing shCTRL or sh*CEBPA*. Fold change in protein expression level were calculated relative to shCTRL condition. K-L) Cell proliferation (K) and viability (L) of PLB-985 cell line transduced with lentiviruses expressing either shCTRL or sh*CEBPA* and exposed to increasing dose of Calcitriol for 5 days. p-values were assessed with unpaired t test (4 independent experiments). M-O) Protein level quantifications of CEBP $\alpha$  p42 (M), P30 isoforms (N) and p42/p30 ratio normalized on  $\beta$ ACTIN. Values were generated with Kruskal-Wallis tests (4 independent experiments). P) Frequency of differentiated CD11+/CD14+ cells in PLB-985 cells transduced with lentiviruses expressing shCTRL or sh*CEBPA* and exposed to increasing doses of calcitriol for 5 days. p-value were assessed with RM one-way ANOVA test (4 independent experiments).

## SUPPLEMENTAL MATERIALS

**Table 1**  
**Antibodies**

Target	Host	Reference	Technique	Usage
4E-BP1	Rabbit	Cell Signalling, 9452	WB	1:1000, O/N +4°C
AKT (pan) (11E7)	Rabbit	Cell Signalling, 4685	WB	1:1000, O/N +4°C
Peroxidase Anti-Mouse IgG(H+L)	Goat	Jackson, 115-035-003	WB	1:40000, 1h RT
Peroxidase Anti-Rabbit IgG(H+L)	Goat	Jackson, 111-035-003	WB	1:40000, 1h RT
$\beta$ -Actin (AC15)	Mouse	Sigma-Aldrich, A5441	WB	1:1000, 1h RT
BCAT1 (OT13F5)	Mouse	Origene, TA504360	WB	1:1000, O/N +4°C
BCAT2	Rabbit	Thermo Scientific, PA5-21549	WB	1:1000, O/N +4°C
CEBP $\alpha$	Rabbit	Cell Signalling, 2295	WB	1:1000, O/N +4°C
HSC70 (B-6)	Mouse	Santa Cruz, sc-7298	WB	1:1000, 1h RT
p70 S6 Kinase (49D7)	Rabbit	Cell Signalling, 2708	WB	1:1000, O/N +4°C
Phospho-4E-BP1 (Thr37/46)	Rabbit	Cell Signalling, 9459	WB	1:1000, O/N +4°C
Phospho-AKT (Ser473) (193H12)	Rabbit	Cell Signalling, 4058	WB	1:1000, O/N +4°C
Phospho-p70 S6 kinase (Thr389)	Rabbit	Cell Signalling, 9205	WB	1:1000, O/N +4°C

**Table 2**  
**Primers used for mRNA expression (RT-qPCR)**

Gene	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
<i>201*</i>	GCTACGACCCTTGGGATCT	AAGTCCCCACCACCTCTTTT
<i>202</i>	TGAAGGCTAAAGACCTAATAGTCAC	TTTGTCAAATACTTCCACTGCATAGT
<i>204*</i>	TGGTTGTCTGAGCCTCCTTT	AAGTCCCCACCACCTCTTTT
<i><math>\beta</math>2M</i>	ACTGAATTCACCCCCACTGA	CCTCCATGATGCTGCTTACA
<i>BCAT1*</i>	CAACTATGGAGAATGGTCCTAAGCT	TGTCCAGTCGCTCTCTTCTCTTC
<i>BCAT2</i>	GCTGGGTGTCAGCCAGCCC	GCCAGAGGACCTGTTACAG
<i>CEBP<math>\alpha</math></i>	TGTGCCTTGGAAATGCAAAC	CGGGAAGGAGGCAGGAAA
<i>MSI2</i>	TGGAAGATGCAATGCTGATGT	CTCACAGACTTTCTCCACAACA
<i>PPIA</i>	GTCAACCCACCGTGTCTT	CTGCTGTCTTTGGGACCTTGT

\*From Tonjes et al., "BCAT1 promotes cell proliferation through amino acid catabolism in gliomas carrying wild-type IDH1"

**Table 3**  
**Primers used for ChIP quantification (qPCR)**

Regions are indicated as distance from the TSS (Transcription Starting Site) of the corresponding gene.

<b>Target region</b>	<b>Forward primer sequence (5'-3')</b>	<b>Reverse primer sequence (5'-3')</b>
<i>HOXC5</i> -TSS	CTCCTACGTAGCCAATTCATTCT	TCTGAGGCCGATCCATAGT
<i>HOXD4</i> +0.4kb	TGGTCTACCCCTGGATGAAG	TGACCTGCTCCCTCAGCTAT
<i>PPIA</i> +1kb	GGGAGTAGCGAAATAGGATGTTAG	CGAAGACTGCATGAGGATCAA
P2- <i>BCAT1</i> +0.6kb	CACAACCTAGGAACTGGGTAAC	GCCAGAGGCTTAGTGTCTAAAG
P2- <i>BCAT1</i> -TSS	TGAACCATTTCTCCACCAG	CCGCTTCCCTGTGTCTTTAT
P2- <i>BCAT1</i> -0.9kb	GTCTGTCTGCAGTCGCTAAA	GAAATATCTGCGCTTGGAAGG
P2- <i>BCAT1</i> -1kb	TCGCGAGCATCCTTGTTTAT	AGCTGCCCTAATGTAGTTTCTC
P2- <i>BCAT1</i> -1.4kb	GTAGGCTCGTGATCGCAATA	TCCAATCCTCCTTCCCTTTC
P1- <i>BCAT1</i> -TSS	ACTCGGATACGCACCCACAGT	CGAAGATTCGGAGCCAGCG
P1- <i>BCAT1</i> -0.7kb	GCTGGGATTACAGATGTGAGAC	GCCACTTGGTATGGGAGATAAA

**Table 4**  
**Primers used for Global DNA Methylation Analysis**

<b>Target region</b>	<b>Forward primer sequence (5'-3')</b>	<b>Reverse primer sequence (5'-3')</b>
P1	ACTCGGATACGCACCCACAGT	CGAAGATTCGGAGCCAGCG
P2	AAATCTGGAGTCCCAGCCT	TCAGAGCGAGTCCATAGCTA

**Table 5**  
**Patient samples and applications**

Patient number	IDH status	Applications
#1	IDH2wt	qPCR (Fig2A,B,E) ; WB (Fig2C, Fig4A) ; Methylation Assay (Fig2D) ; PDX (Fig3A-E, extended Fig3C-F, extended Fig4A-B) ; shBCAT1 (Fig3F, extended Fig3A)
#2	IDH2wt	BCAA tracing (Fig1A-B) ; qPCR (Fig2A,B,E) ; WB (Fig2C, Fig4A) ; Methylation Assay (Fig2D)
#3	IDH2wt	qPCR (Fig2A,B,E) ; WB (Fig2C, Fig4A) ; Methylation Assay (Fig2D)
#4	IDH2wt	BCAA tracing (Fig1A-B) ; qPCR (Fig2A,B,E) ; WB (Fig2C) ; Methylation Assay (Fig2D) ; shBCAT1 (Fig3F, extended Fig3A)
#5	IDH2wt	BCAA tracing (Fig1A-B) ; qPCR (Fig2A,B,E) ; WB (Fig2C, Fig4A) ; Methylation Assay (Fig2D)
#6	IDH2m	WB (Fig2C, Fig4A) ; Methylation Assay (Fig2D)
#7	IDH2 R140Q	qPCR (Fig2A,B,E) ; WB (Fig2C, Fig4A, Fig5H) ; Methylation Assay (Fig2D) ; PDX (Fig3A-E, extended Fig3C-F) ; shBCAT1 (extended Fig3A) ; IC50 (extended Fig3G) ; BCATi inhibitor (extended Fig3I)
#8	IDH2 R140Q	qPCR (Fig2A,B,E) ; WB (Fig2C, Fig4A) ; Methylation Assay (Fig2D) ; shBCAT1 (extended Fig3A) ; IC50 (extended Fig3G) ; BCATi inhibitor (extended Fig3I)
#9	IDH2 R140Q	qPCR (Fig2A,B,E) ; WB (Fig2C, Fig4A) ; Methylation Assay (Fig2D) ; IC50 (extended Fig3G) ; BCATi inhibitor (extended Fig3I)
#10	IDH2 R172K	BCAA tracing (Fig1A-B) ; qPCR (Fig2A,B,E) ; WB (Fig2C, Fig4A, Fig5H) ; Methylation Assay (Fig2D) ; shBCAT1 (Fig3F, extended Fig3A) ; IC50 (extended Fig3G) ; PDX (extended Fig4A-B) ; GABA inhibitor (extended Fig3H)
#11	IDH2 R172K	BCAA tracing (Fig1A-B) ; qPCR (Fig2A,B,E) ; WB (Fig2C, Fig4A) ; Methylation Assay (Fig2D) ; IC50 (extended Fig3G) ; GABA inhibitor (extended Fig3H)
#12	IDH2 R140Q	BCAA tracing (Fig1A-B) ; qPCR (Fig2A,B,E) ; WB (Fig2C, Fig4A, Fig5H) ; Methylation Assay (Fig2D) ; shBCAT1 (Fig3F, extended Fig3A) ; IC50 (extended Fig3G) ; GABA inhibitor (extended Fig3H)
#13	IDH2wt	WB (Fig5H) ; shBCAT1 (extended Fig3A)
#14	IDH2wt	WB (Fig5H) ; shBCAT1 (extended Fig3A)
#15	IDH2wt	qPCR (Fig2A,E)
#16	IDH2wt	qPCR (Fig2A,E)
#17	IDH2wt	qPCR (Fig2A,E) ; shBCAT1 (Fig3F, extended Fig3A)
#18	IDH2 R140Q	qPCR (Fig2A,E) ; shBCAT1 (extended Fig3A)
#19	IDH2 R140Q	qPCR (Fig2A,E)
#20	IDH2 R140Q	shBCAT1 (Fig3F, extended Fig3A)
#822	IDH2wt	ChIP-qPCR (Fig2G)
#916	IDH2wt	ChIP-qPCR (Fig2G)
#1733	IDH2wt	ChIP-qPCR (Fig2G)
#2589	IDH2wt	ChIP-qPCR (Fig2G)
#3449	IDH2wt	ChIP-qPCR (Fig2G)
#4847	IDH2wt	ChIP-qPCR (Fig2G)
#4040	IDH2m	ChIP-qPCR (Fig2G)
#4616	IDH2m	ChIP-qPCR (Fig2G)
#6716	IDH2m	ChIP-qPCR (Fig2G)



---

# **4. Discussion et conclusions**

---

## 4.1. DISCUSSION

Au cours de ce travail, nous avons établi l'importance de l'axe leucine/BCAT1/mTORC1 dans le contrôle de la croissance cellulaire des blastes *IDH2m*, et nous avons identifié le facteur de transcription CEBPA comme un relais moléculaire de mTORC1, suggérant que la signalisation BCAT1/mTORC1/CEBPA joue un rôle dans le processus de différenciation des cellules myéloïdes.

Individuellement, ou collectivement, tous les acteurs de cette signalisation sont des acteurs connus des processus néoplasiques. Les BCAA, outre leur participation à la synthèse des protéines, sont les principaux donneurs d'azote lors de la synthèse d'alanine et de glutamine<sup>392</sup>. La leucine est un AA essentiel singulier dans la mesure où elle active la voie anabolique mTOR<sup>144,393</sup> (cette activation implique la Sestrin2<sup>394,395</sup>), qui est un régulateur critique de l'activité cellulaire par le contrôle que ce complexe multiprotéique exerce sur la biogenèse ribosomale, la traduction des protéines, la croissance, la prolifération cellulaire et l'autophagie<sup>396</sup>. Une activation constitutive de mTOR est fréquemment observée chez les patients atteints de LAM (souvent en association avec l'inactivation de TP53 par la surexpression du gène *MDM2*<sup>397-399,400</sup>). Cette activation augmente les capacités anti-apoptotiques des cellules<sup>401</sup> et contribue à la chimiorésistance et la progression de la maladie, ce qui affecte le pronostic<sup>402</sup>. Les implications de mTORC1 et de son substrat S6 Kinase 1 (S6K1) ont été montrées dans le développement des leucémies<sup>347</sup> et des cancers en général<sup>403</sup>. Dans le système hématopoïétique, l'importance de la signalisation BCAT1/mTOR a été illustrée à la fois dans le développement physiologique de certains lignages (par exemple, dans les lymphocytes T CD4+<sup>404</sup>) et dans des exemples d'hémopathies malignes<sup>378</sup>. L'altération du métabolisme des BCAA est aussi directement impliquée dans un large éventail de cancers humains<sup>353</sup> et la résistance aux traitements<sup>405,406</sup>.

**Les résultats obtenus au cours de cette étude ont renforcé certaines observations.**

- L'inhibition de BCAT1 est une approche thérapeutique dans les gliomes et LAM *IDHm*

Paradoxalement, contrairement à ce que nous avons identifié dans la LAM *IDH2m*, dans les gliomes *IDH1m*, le gène *BCAT1* est moins exprimé que dans les cellules de gliome n'exprimant pas la mutation (*IDH1wt*)<sup>388</sup>. Dans ce modèle, la forte expression de *BCAT1* contribue à la croissance des gliomes *IDH1wt* ; ceci est corrélé aux observations cliniques qui signalent que les gliomes *IDH1wt* présentent une évolution défavorable plus rapide que leurs homologues *IDH1m*. Dans ces tumeurs, la voie BCAA reste catabolique (dégradation de la leucine et production de glutamate), les BCAA servant de donneurs de groupement amine dans le cycle glutamine/glutamate, cette situation crée une hyper-dépendance des cellules à l'activité de BCAT1 pour la production de glutamate, AA essentiel au fonctionnement des cellules neurales<sup>390</sup>. Il a aussi été montré que l'oncométabolite D-2HG affecte l'activité de BCAT1 dans les cellules neurales *IDH1m* et qu'à forte dose, le D-2HG réduit leur croissance<sup>390</sup>. Nous faisons la même observation, d'une inhibition de l'activité de BCAT1 par le D-2HG dans les cellules LAM *IDH2m*, et d'une contribution essentielle de son activité à la croissance des blastes.

- L'activité BCAT1 est importante dans l'hématopoïèse pathologique

Il existe peu d'études rapportant un rôle de BCAT1 dans les hémopathies malignes. L'importance de son activité catabolique a été rapportée dans la leucémie myéloïde chronique (LMC) avec fusion *BCR-ABL*, pour laquelle *BCAT1* est fortement surexprimé lors de la crise blastique, étape conduisant la LMC vers la LAM<sup>378</sup>. Dans ce modèle, la réduction de l'expression de *BCAT1* par un shRNA ou son inhibition pharmacologique par la gabapentine réduit l'activité de mTORC1 et diminue la concentration intracellulaire de leucine (la réaction est catabolique). L'efflux de leucine et l'activité mTOR en aval sont également requises pour le développement et la progression de la LAM induite par l'oncogène MLL-AF9 chez l'animal, à travers l'activité du transporteur SLC1A5/ASCT2 responsable de l'absorption de plusieurs AA dont la glutamine et la leucine<sup>407</sup>. Enfin, BCAT1 régule le catabolisme des BCAA dans la population des CSL<sup>379</sup> ce qui en fait une voie métabolique importante. En effet, les CSL présentent des taux élevés d'AA et sont plus sensibles que les blastes (arrêtés à un stade progéniteurs/précurseurs) à la perte d'AA pour leur métabolisme mitochondrial et leur survie<sup>95</sup>. Cette dépendance aux AA pourrait expliquer

les réponses profondes et durables observées chez les patients atteints de LAM et naïfs de tout traitement, traités avec l'inhibiteur de BCL-2 venetoclax (en combinaison avec l'azacitidine)<sup>96,101</sup>, situation qui affecte le métabolisme énergétique mitochondrial OXPHOS<sup>96</sup> mais diminue également l'expression des transporteurs d'AA dans les CSL<sup>95</sup>. On peut envisager que les thérapies qui ciblent l'activité BCAT1 dans les CSL, comme l'analogue de la leucine ERG240<sup>374</sup> ou qui appauvrissent sélectivement le milieu en leucine, ou encore les molécules qui inhibent les activités aminopeptidase (enzymes impliquées dans la dégradation des protéines et le relargage des AA, ce qui entraîne une baisse des niveaux d'AA libres<sup>408</sup>), pourraient être des approches thérapeutiques intéressantes, au même titre que l'inhibition de BCL-2<sup>306</sup>. Le tosedostat, en particulier, est un inhibiteur de la leucine aminopeptidase (LAP) et il a montré une certaine efficacité en association avec la décitabine ou la cytarabine, chez des patients âgés atteints de LAM *de novo*<sup>409</sup>.

- L'expression de *BCAT1* est soumise à régulation épigénétique

La régulation de l'expression du gène *Bcat1* par le complexe PRC2 a été identifiée dans un modèle murin de LAM induite par l'expression de l'oncogène N-Ras et la perte conjointe de l'activité Ezh2<sup>376</sup>. Dans cet exemple, les deux promoteurs du gène *Bcat1*, P1 et P2, sont sensibles à la présence de la marque H3K27me3. Nos travaux montrent des niveaux de marque H3K27me3 sur les deux promoteurs du gène *BCAT1* qui diffèrent suivant que les blastes expriment ou non *IDH2m*, confirmant l'implication du complexe PRC2 dans la régulation transcriptionnelle du gène chez l'homme. Une explication possible d'une activité PRC2/EZH2 différente en contexte *IDH2m* est que la lysine déméthylase KDM6A/UTX qui déméthyle la marque H3K27 et est dépendante de l' $\alpha$ KG, soit inhibée fonctionnellement par le métabolite D-2HG.

Nous observons également dans les blastes primaires des deux contextes génétiques (*IDH2m* et *IDH2wt*) des niveaux différents de méthylation sur résidus CpG au niveau des régions P1 et P2. En effet, dans les cellules LAM *IDH2m*, le promoteur P2 est très largement méthylé comparativement au promoteur P1. Cette observation a déjà été rapportée dans le cas des gliomes humains *IDH1m*<sup>388</sup> suggérant que l'hyperméthylation de P2 est liée à l'expression des mutations *IDH* en général. On peut envisager que dans ces deux types tumoraux, l'inactivation fonctionnelle des protéines TET par l'oncométabolite D-2HG affecte préférentiellement la région promotrice P2. Les raisons de l'activité différente des deux promoteurs ne sont pas connues. Dans le cas du locus *Bcat1* murin, l'activité des promoteurs

P1 et P2 semble différente selon le statut de différenciation des cellules myéloïdes (CSH, MPP, GMP), P2 semblant plus actif que P1 dans les cellules engagées GMP<sup>376</sup> (cette observation est liée à la présence de marques épigénétiques différentes sur ces deux régions mais n'a pas été commentée dans l'article). Les facteurs de transcription liant ces deux régions n'ont pas été recherchés. Par ailleurs, les différences fonctionnelles pouvant exister entre isoformes *Bcat1* initiées à ces deux promoteurs, ne sont pas connues. L'analyse par ChIP-qPCR de la marque H3K27me3 sur blastes primaires *IDH2m* et *IDH2wt* montre que les deux régions P1 (CpG hypométhylés) et P2 (CpG hyperméthylés) sont peu soumises à l'empreinte de cette marque en contexte *IDH2m*. Cette observation est en accord avec la réactivation de l'activité des deux promoteurs dans les blastes *IDH2m*; il s'agit donc d'un mécanisme de levée de répression transcriptionnelle. Il est établi que la marque H3K27me3 est peu déposée lorsque les régions géniques sont hyperméthylées sur résidus CpG<sup>410</sup>, ce qui correspond à la situation que nous mettons en évidence dans les blastes *IDH2m*. L'importance des deux marques épigénétiques dans le contrôle de l'expression génique est complexe; à l'instar de ce que nous observons pour le locus *BCAT1* dans les cellules LAM *IDH2m*, dans l'exemple des gliomes, c'est la marque H3K27me3 qui contrôle de façon massive les programmes d'expression génique, plus que le statut de méthylation sur îlots CpG<sup>411</sup>.

Le gène *BCAT1* est aussi soumis à des régulations transcriptionnelles par le biais d'autres modifications épigénétiques dans les tumeurs solides. En particulier, la surexpression de *BCAT1* a été associée à une baisse du dépôt des marques répressives H3K9me2/H3K9me3 au niveau du promoteur P1, sous contrôle de SUV39H1<sup>406</sup>. Dans le cancer du sein, la surexpression de *BCAT1* est associée à l'activité de DOT1L<sup>412</sup>, histone H3K79 méthyltransférase bien connue des hémopathies malignes. Enfin il a été décrit une interaction et stabilisation du transcrit *BCAT1* par la protéine liant l'ARN MUSASHI2 (*MSI2*) dans les cellules de LMC<sup>378</sup>. Nous avons montré que le transcrit *MSI2* est induit dans la lignée cellulaire K562 en réponse à une exposition au D-2HG, et que les niveaux d'expression de *MSI2* dans les LAM avec mutation *IDH2*, et issues des bases de données publiques, sont significativement supérieurs au contexte *IDH2wt*.

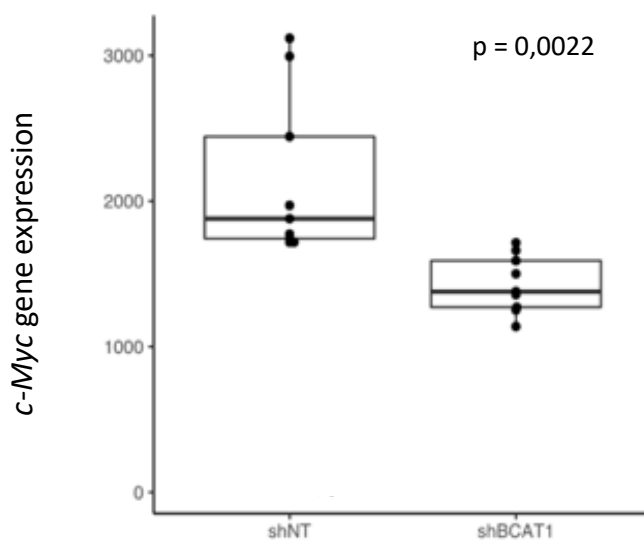
**Nos résultats ont permis d'établir des relations fonctionnelles entre *BCAT1* et deux facteurs importants de l'hématopoïèse maligne, *MYC* et *CEBPA*.**

L'identification d'un lien entre l'activité de BCAT1 et la différenciation myélo-monocytaire nous a conduit à chercher des connexions possibles entre ces deux processus. Il existe déjà des exemples de l'implication d'AA essentiels dans le blocage d'un processus de différenciation hématopoïétique puisque une concentration intracellulaire élevée en valine favorise l'expansion, l'auto-renouvellement et la survie des CSH<sup>372,413,414</sup>. A l'inverse, la diminution en valine engage la différenciation des CSH en progéniteurs hématopoïétiques<sup>413</sup>. De façon intéressante, la voie mTORC1/S6K1/MYC est un point de contrôle de la différenciation myéloïde. La délétion de Raptor (activateur de mTORC1) chez la souris induit l'absence de monocytes et bloque de la différenciation au stade GMP. À l'inverse, l'activation excessive de mTORC1 par délétion du complexe tuberous sclerosis 2 (TSC2), inhibiteur de mTOR, favorise le développement et la maturation spontanée des cellules myéloïdes<sup>415</sup>. La différenciation monocytaire/macrophagique liée à la signalisation mTORC1, implique l'expression des facteurs de transcription PU.1 et interferon regulatory factor 8 (IRF8) et l'activation de MYC ; l'inhibition de MYC altère cette différenciation<sup>416</sup>.

- Nos travaux montrent que les activités BCAT1 et MYC sont fonctionnellement liées

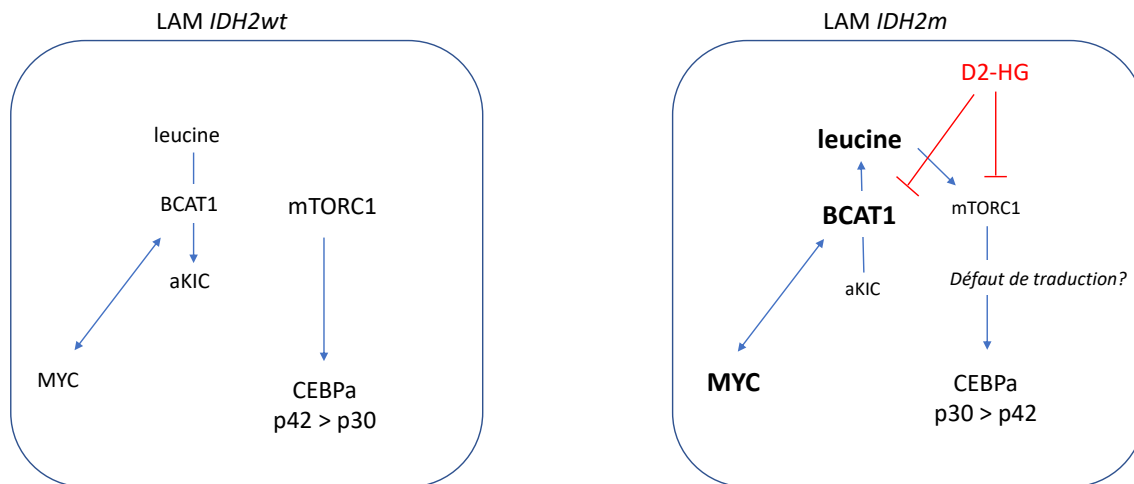
L'inactivation de *BCAT1*, dans notre modèle PDX induit un arrêt de la prolifération des cellules LAM *IDH2m* et une différenciation myélo-monocytaire partielle, un effet double qui a également été rapporté dans l'exemple de l'inhibition de l'enzyme dihydroorotate déshydrogénase (DHODH) qui participe à la voie de synthèse *de novo* des pyrimidines<sup>281,282</sup>. Ce résultat indique que BCAT1 participe à l'équilibre étroitement contrôlé entre prolifération et différenciation qui caractérise l'homéostasie des progéniteurs myéloïdes (une sortie du cycle cellulaire est nécessaire pour la différenciation terminale). Concernant la prolifération cellulaire, nos analyses d'expression génique et d'enrichissements fonctionnels (GSEA) ont défini plusieurs signatures moléculaires significatives, parmi lesquelles les signatures « HALLMARK MYC TARGETS V1 » et « HALLMARK MYC TARGETS V2 » qui révèlent un lien fonctionnel entre les activités de BCAT1 et MYC. Nous mettons en évidence une corrélation inverse, e.g., les gènes induits par MYC sont négativement enrichis dans les blastes *IDH2<sup>R140Q</sup>* alors qu'ils sont positivement enrichis dans les cellules *IDH2wt* après inactivation de *BCAT1* par shRNA, confirmant que *IDH2m* inverse le sens de la réponse biologique liée à MYC. Cependant, nous n'observons pas d'effet sur l'accumulation du transcrite MYC dans les blastes *IDH2<sup>R140Q</sup>* en réponse à l'inactivation de *BCAT1*.

En réanalysant les données transcriptomiques obtenues en réponse à l'inactivation de *BCAT1* dans 3 lignées hématopoïétiques non mutées pour *IDH* (HL-60, SKM-1, MOLM-13)<sup>379</sup>, nous mettons en avant un point important qui est que le gène *MYC* lui-même est également moins induit transcriptionnellement dans des lignées cellulaires *IDH2wt* après invalidation de *BCAT1* (**Figure 22**). Ainsi, c'est *BCAT1* qui agit comme un activateur de l'activité intrinsèque de *MYC* dans les cellules de LAM, une situation qui a déjà été observée dans des modèles de cancer du poumon<sup>417</sup>. Il n'est pas exclu que cette induction de l'activité de *MYC* passe par des modifications post-traductionnelles sur le facteur *MYC*<sup>418-421</sup>.



**Figure 22** : Expression de *MYC* dans 3 lignées hématopoïétiques invalidées pour *BCAT1*

Ces différents résultats confirment donc une interdépendance des activités de *BCAT1* et *Myc* indépendamment de la présence d'une mutation *IDH2* mais aussi qu'il est fortement probable que les mécanismes de régulation qui contrôlent l'induction du transcrit *MYC* soient différents entre les modèles cellulaires et les blastes primaires. Nous proposons une image synthétique de la relation qui existe entre *BCAT1* et *MYC* dans les blastes primaires (**Figure 23**).

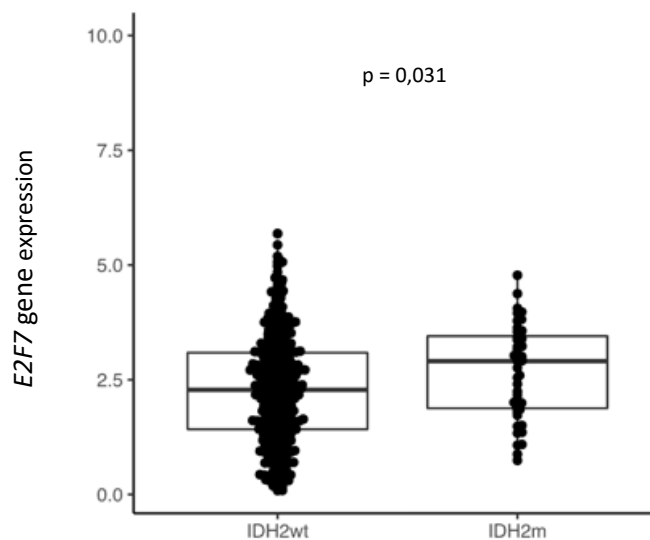


- Sens catabolique de la voie BCAT1 (production d'aKIC)
  - Les activités de BCAT1 et MYC sont inter-dépendantes
  - MYC est actif
  - L'invalidation de BCAT1 augmente l'activité MYC (activation de ses cibles)
  - L'isoforme CEBPa p42 est prépondérante : contexte plus « permissif » pour la différenciation et moindre effet de p42 sur la prolifération
- Sens anabolique de la voie BCAT1 (production de leucine)
  - Les activités de BCAT1 et MYC sont inter-dépendantes
  - L'activité MYC est plus élevée qu'en contexte *IDHwt*
  - L'invalidation de BCAT1 diminue l'activité MYC (inhibition de ses cibles)
  - L'isoforme CEBPa p30 est prépondérante : blocage de la différenciation et induction de la prolifération

**Figure 23** : Interconnexion des activités BCAT1 et MYC dans les cellules primaires de LAM

Nos analyses GSEA indiquent également l'existence d'une signature moléculaire « HALLMARK E2F TARGETS » qui est, à l'instar des signatures MYC, négativement enrichie dans les blastes *IDH2<sup>R140Q</sup>* alors qu'elle est positivement enrichie dans les cellules *IDH2wt*. Ces données indiquent que les facteurs MYC et E2F sont beaucoup plus actifs dans les blastes *IDH2<sup>R140Q</sup>* à l'état stationnaire, que dans les blastes *IDH2wt*. MYC peut induire la surexpression du gène *E2F<sup>418</sup>*. Nos analyses *in silico* de bases de données publiques (database Beat-AML/OHSU) montrent que le facteur E2F7 de la famille E2F est induit transcriptionnellement dans les blastes *IDH2m* (**Figure 24**).





**Figure 24** : Expression de E2F7 dans les blastes *IDH2wt* et *IDH2m*

Il est intéressant de noter que la plupart des LAM avec mutation *IDH* activent MYC, (pas forcément E2F) vraisemblablement pour contrecarrer les effets antiprolifératifs (contre-intuitifs) du D-2HG<sup>422</sup>. Cet effet pourrait être notamment lié à l'inhibition de TET2 car une activité accrue de MYC a été associée à la perte de fonction de TET2 dans les LAM, sans induction transcriptionnelle de MYC dans plusieurs modèles<sup>423,424</sup>. De plus, des études récentes importantes soulignent l'interdépendance entre les anomalies *IDH1* et une hausse de l'activité de MYC dans les gliomes *IDH1m* conférée par la présence d'un polymorphisme en 8q24<sup>425,426</sup>. MYC participe à la reprogrammation métabolique dans les cellules cancéreuses<sup>427</sup>. Sans être systématiquement directs, les liens fonctionnels entre MYC et le métabolisme des AA, essentiels ou non, sont établis dans plusieurs modèles<sup>427,428</sup>. Par exemple, un circuit MYC/SLC7A5/SLC43A1 coordonne l'absorption élevée d'AA essentiels, y compris de la leucine, et l'activation de mTORC1<sup>428</sup>. MYC active l'expression de gènes codant pour des transporteurs d'AA (*SLC7A5*, *SLC43A1* et également *SLC1A5/ASCT2*) qui ne sont pas que des transporteurs et pourraient influencer sur le niveau intracellulaire d'AA<sup>429</sup>. Par ailleurs, le gène *BCAT1* (initialement appelé *ECA39*) a été décrit comme une cible du facteur MYC<sup>430-432</sup>, soulignant l'interdépendance des deux activités. Dans deux modèles de tumeurs solides, MYC se lie à la région promotrice du gène *BCAT1* et active son expression<sup>384,433</sup>. Nous n'avons pas recherché si MYC participe à l'induction transcriptionnelle de *BCAT1* dans notre modèle.

Concernant la différenciation, l'analyse GSEA indique l'induction d'un programme d'expression génique pro-différenciant (GO : 0045597), mais qu'il est difficile d'exploiter car très générique.

- Nos travaux identifient CEBPA comme un relai de l'axe BCAT1/mTORC1

Nous avons testé l'hypothèse que l'activité de mTORC1, qui est partiellement contrôlée par l'activité de BCAT1 via la leucine, soit relayée par le facteur de transcription CEBPA. En effet, mTOR contrôle la traduction du transcrit *CEBPA* par l'intermédiaire des facteurs d'initiation de la traduction eIF-4E<sup>434</sup> (il existe aussi une initiation de la traduction des transcrits *CEBPA* par les facteurs eIF-2 $\alpha$ , relayant l'activité de la kinase AKT/protéine kinase B (PKB)). mTORC1 contrôle également la traduction des transcrits *CEBP $\beta$*  à travers la phosphorylation des protéines 4E-BP<sup>435</sup>. Un argument fonctionnel important est qu'il existe des exemples de résistance à l'énasidenib<sup>335</sup> et à l'ivosidenib (nos résultats non publiés) qui sont associés à des mutations de *CEBPA*, on peut donc envisager que l'activité de ce facteur participe de façon directe à l'effet différenciant des inhibiteurs. Un autre argument justifiant l'étude de CEBPA est que ce facteur de transcription semble « actif » en contexte LAM *IDHm* dans plusieurs modèles (lignées cellulaires et PDX), sans que les bases moléculaires de cette activation soient établies<sup>436,437</sup>.

#### *CEBPA est un acteur majeur de la myélopoïèse normale et pathologique*

Dans l'hématopoïèse normale, les facteurs CEBPA sont impliqués dans la détermination des progéniteurs hématopoïétiques<sup>376</sup> et sont des régulateurs majeurs de la myélopoïèse<sup>438</sup>. L'inactivation de *Cebpa* dans le système hématopoïétique chez la souris adulte empêche la génération des progéniteurs granulocytes/monocytes (GMP) et entraîne un blocage du développement des neutrophiles au stade CMP<sup>439</sup>. Ces facteurs se lient aux promoteurs et/ou enhancers de gènes liés à la différenciation myéloïde, tels que *colony stimulating factor 3 receptor (CSF3R)*, *IL-6R*, *CCAAT enhancer binding protein epsilon (CEBPE)*, *growth factor independent 1 transcriptional repressor (GFI-1)* ou *Kruppel-like factor 5 (KLF5)*<sup>440</sup> ; ils peuvent agir comme répresseurs transcriptionnels en association avec les facteurs SPI1/PU.1 ou CEBP $\beta$ <sup>441,442</sup>. Ils interagissent également physiquement avec des modificateurs chromatinieniens comme TET2<sup>251</sup> ou DNMT3A<sup>443</sup>. Dans ce dernier exemple, cette

interaction inhibe l'activité méthyltransférase de DNMT3A. L'activité des facteurs CEBPA reste cependant complexe, à l'image de ce que l'on sait de l'activité des facteurs « pionniers ». De façon générale, les signatures moléculaires du facteur CEBPA proposées dans la littérature sont très variées.

Le gène *CEBPA* comprend un seul exon mais deux sites d'initiation de la traduction permettant l'expression d'une protéine de 42 kDa (p42) et d'une protéine de 30 kDa (p30) tronquée des 117 premiers AA à l'extrémité N-terminale, région qui inclut le domaine de transactivation 1 (TAD1) ; en conséquence l'isoforme p30 présente un potentiel de transactivation plus faible. L'isoforme p30 agit comme un dominant négatif de p42 et bloque la liaison à l'ADN de p42 et la transactivation des gènes cibles de p42<sup>444</sup>. Ces isoformes ont des fonctions antagonistes : l'isoforme p30 inhibe la différenciation dans le système hématopoïétique<sup>444</sup>, alors que l'isoforme p42 est associée à un arrêt de prolifération et à l'induction d'une différenciation<sup>434</sup>.

Des mutations perte de fonction de CEBPA sont présentes dans 10% des LAM<sup>438</sup> et sont souvent associées aux LAM avec mutations *IDH*<sup>445</sup>. Ces mutations entraînent l'expression de l'isoforme p30 ce qui induit une prolifération accrue et une différenciation minimale des progéniteurs myéloïdes<sup>446,447</sup>, favorable au développement de la LAM. De manière intéressante, le gène *MSI2* est une cible critique de p30<sup>448</sup>. p30 soutient aussi la croissance leucémique par l'induction du gène 5'-Nucleotidase Ecto (*NT5E*)/*CD73*<sup>449</sup>. *Nt5e* code pour l'ectoenzyme NT5E/CD73 qui catalyse la conversion de l'adénosine monophosphate (AMP) en adénosine et la contribution de cette activité enzymatique à l'échappement immunitaire des tumeurs solides a été montrée.

Pour étudier l'induction de la différenciation myéloïde par la signalisation BCAT1, nous avons utilisé la lignée cellulaire PBL-985 (dérivée de HL-60) et un composé inducteur de différenciation, le calcitriol, qui est un métabolite de la vitamine D3 (1,25(OH)2D3). Le calcitriol se comporte comme un agoniste du récepteur de la vitamine D (VDR), qui est, comme les récepteurs des rétinoïdes RAR, un facteur de transcription inductible par son ligand. L'expression de VDR peut être induite par des agents hypométhylants<sup>450,451</sup>. Chez l'homme, le calcitriol est produit par le rein à la suite de la conversion cutanée du 7-déhydrocholestérol en vitamine D3 sous l'action des UVB, les sources alimentaires de vitamine D3 étant peu nombreuses. Le calcitriol contrôle plus de 200 gènes régulant la prolifération et la différenciation cellulaires, l'apoptose et d'autres processus. La vitamine D3 et ses métabolites contrôlent également un réseau génique important, par l'activation de nombreux facteurs de transcription<sup>452,453</sup>. Des arguments fonctionnels lient la

signalisation vitamine D3/VDR et la différenciation dans les cellules myéloïdes U937<sup>454</sup> et les cellules LAM *IDHm*<sup>436</sup>. Dans le contexte de LAM *IDHm*, l'induction de la différenciation par le calcitriol semble impliquer CEBPA<sup>436</sup>; les facteurs CEBPA et ETS1 ont également été associés à l'activité de la vitamine D3 dans d'autres systèmes<sup>452,453</sup>.

Nous montrons que le calcitriol induit une différenciation partielle des cellules PLB-985 par l'apparition de marqueurs membranaires CD11b et CD14, conjointement à la diminution des marqueurs membranaires CD13 et CD33. Cette différenciation s'accompagne d'une accumulation de transcrits *CEBPA* et d'une accumulation de l'isoforme p42 dont on connaît les activités pro-différenciantes (une accumulation de p42 a été rapportée dans un autre modèle de différenciation<sup>455</sup>), au détriment de l'isoforme p30 (la quantité totale de protéine CEBPA augmente). Nous confirmons ainsi que le traitement des cellules PLB-985 par le calcitriol est un bon modèle d'étude de la différenciation myéloïde impliquant CEBPA.

Nous montrons que le traitement calcitriol induit une diminution de l'accumulation des transcrits *BCAT1* et de la protéine BCAT1, qui peuvent être le reflet de l'engagement en différenciation des cellules ; en effet l'expression du gène *BCAT1* s'éteint au fur et à mesure de l'engagement en différenciation (**Figure 25**). La diminution de l'activité de BCAT1 *per se* (par l'usage d'un shRNA que nous avons validé et qui a été obtenu par collaboration<sup>378</sup>) diminue conjointement la prolifération et la viabilité cellulaire *in vitro*. Nous montrons également que diminution de l'activité de BCAT1 entraîne la différenciation des cellules puisque dans cette configuration (inhibition de *BCAT1* et calcitriol), l'accumulation de l'isoforme p42 est majorée. Dans ce contexte, des populations cellulaires CD11b+CD14+ apparaissent en culture. Ces observations suggèrent de plus, qu'en l'absence de BCAT1, la différenciation pourrait être déjà amorcée dans les cellules PLB985 et favorisée par le traitement calcitriol. L'inhibition de *BCAT1* en association avec le calcitriol, entraîne une diminution de la protéine CEBP $\alpha$  exprimée suggérant que l'activité de BCAT1 influe sur la transcription et/ou la traduction des isoformes p42 et p30 de CEBP $\alpha$ . Cette association entraîne également une disparition de la protéine MYC, indiquant que la différenciation myéloïde BCAT1-dépendante, si elle induit CEBPA, inhibe conjointement MYC. Nous étudions actuellement l'accumulation des transcrits MYC dans ce contexte.

L'utilisation d'un shRNA dirigé contre *CEBPA* (banque MiR Zuber<sup>456</sup>) *in vitro*, diminue significativement la prolifération cellulaire mais n'impacte pas la viabilité cellulaire. De manière surprenante, l'usage du shCEBPA favorise l'accumulation de l'isoforme p42. La diminution d'activité de CEBPA (par la majoration de p42) associée à une exposition au

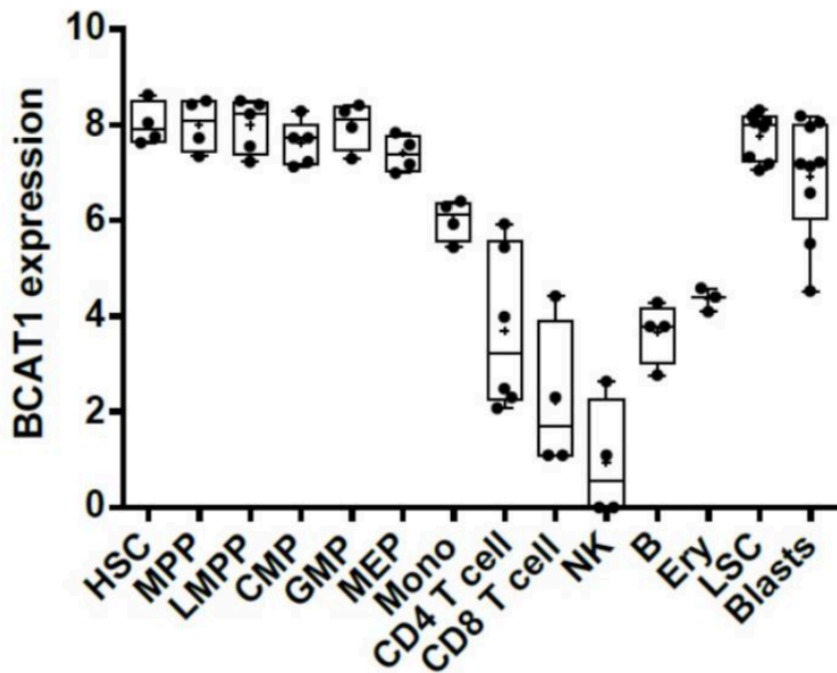
calcitriol, entraîne la différenciation des cellules comme en atteste l'apparition de populations cellulaires CD11b+CD14+ en culture. Nous cherchons aujourd'hui à comprendre les modalités de traduction des isoformes p30 et p42 dans notre modèle, puisque c'est à ce niveau que s'opère l'activité de mTORC1.

## 4.2. CONCLUSIONS

L'identification d'une voie métabolique se prêtant à un ciblage thérapeutique (gabapentine ou inhibiteurs BCAT1 plus spécifiques) dans la LAM *IDHm* est une observation originale de ce travail. Nos observations mettent en évidence une dépendance à la leucine et à l'activité de BCAT1 des blastes *IDH2m* qui peut évoquer l'activité métabolique des CSL<sup>320</sup>.

Un point intéressant est la valeur pronostic de l'expression élevée de *BCAT1* chez les patients atteints de LAM. Cette observation qui avait été établie sur de petites cohortes de patients atteints de LAM<sup>378,379</sup> a été confirmée au cours de notre étude par l'analyse d'un nombre élevé d'échantillons (travail de thèse de Nicolas Poulain dans l'équipe) utilisant des bases de données publiques notamment OHSU/Beat AML<sup>445</sup>. Dans ces échantillons, l'activité de BCAT1 est catabolique ; il est possible que l'activité de BCAT1 soit tout autant requise au développement de la LAM *IDHwt* (bien que de façon moins exclusive que pour les LAM *IDHm* qui présentent une hypoprolifération) puisque cette voie contrôle la prolifération cellulaire via mTOR et répond à des besoins métaboliques induits par le contexte moléculaire. L'association d'un inhibiteur de BCAT1 à une chimiothérapie d'induction conventionnelle pourrait présenter un intérêt thérapeutique mais cependant, il n'existe pas encore d'inhibiteur spécifique de BCAT1 de grade clinique.

Il sera aussi intéressant d'établir si l'activité de BCAT1 participe à l'évolution des ARCH/CHIP<sup>24,457-459,460</sup> ou des CHIP développées post-traitement<sup>461</sup>, lorsque celles-ci sont porteuses d'une anomalie *IDH*. Dans l'hématopoïèse normale, *BCAT1* est fortement exprimé dans les CSH et diminue progressivement après le stade progéniteurs/précurseurs, lors de l'engagement de ces cellules en différenciation (**Figure 25**). L'expression de *BCAT1* et son activité semblent donc représenter une caractéristique métabolique importante de la biologie des CSH, normales ou leucémiques.



**Figure 25** : Expression de *BCAT1* dans les cellules hématopoïétiques

L'expression de *BCAT1* est élevée dans les CSH et progéniteurs multipotents et diminue progressivement lors de l'engagement en différenciation ; elle est également élevée dans les cellules leucémiques (LSC et blastes) (GSE74246 dataset).

Certains points n'ont pas été résolus :

i) De façon intéressante, le traitement de cellules primaires de LAM *IDH2m* par la gabapentine diminue significativement le taux de D-2HG (cette inhibition mime l'effet de l'inhibiteur AG221/enasidenib) mais ce résultat n'a pour le moment pas été plus approfondi. On peut cependant envisager que l'inhibition par la gabapentine de l'activité de *BCAT1*, en diminuant le taux d' $\alpha$ KG, diminue la production de D-2HG puisque l'oncométabolite en est issu. D'autres études ont montré un lien direct entre *BCAT1* et D-2HG. L'inhibition de *BCAT1* par le composé ERG240 dans les macrophages humains activés réduit le pool d' $\alpha$ KG et le niveau de 2-HG (principalement de L-2HG)<sup>375</sup> ; ce qui n'est pas attendu si l'on considère que l'enzyme *BCAT1* consomme l' $\alpha$ KG dans ces cellules (sens catabolique). Dans les gliomes *IDH1m*, pour lesquels la voie *BCAT1* est également catabolique (consommation de l' $\alpha$ KG), l'inhibition de la signalisation PI3K/mTOR conduit à une diminution du D-2HG (associée à une augmentation de la survie)<sup>462</sup>.

La compréhension de ces mécanismes requière de mieux comprendre le statut métabolique de ces cellules et l'homéostasie des métabolites  $\alpha$ KG et 2HG dans ces différents types cellulaires. Dans le cas des cellules de LAM *IDH2m*, la diminution du niveau de D-2HG

pourrait contribuer à l'induction de la différenciation par la réactivation de l'activité des enzymes régulant la méthylation des histones et de l'ADN (y compris TET2), entre autres.

ii) Le niveau de méthylation des transcrits MYC et CEBPA n'a pas été étudié. Il a été établi qu'en contexte *IDHm*, les deux transcrits MYC et CEBPA sont méthylés de façon anormale sur leurs résidus adenosines (N6-methyladenosine, m6A). Cette hyperméthylation est liée à l'inhibition fonctionnelle par le métabolite D-2HG de l'enzyme fat mass and obesity-associated protein (FTO) responsable de la déméthylation des résidus m6A sur les ARNs<sup>422,463,464</sup>. Cette hyperméthylation diminue la stabilité et la traduction des transcrits<sup>465</sup> et dans le cas de MYC, cela conduit de façon paradoxale à la réduction de la croissance tumorale<sup>466</sup> (ce qui pourrait expliquer que les cellules LAM *IDHm* cherchent à augmenter l'activité de MYC de façon indépendante de l'expression du gène *MYC* pour soutenir la croissance). Néanmoins, dans ces conditions, la synthèse des protéines et la croissance cellulaire sont activement supportées par la signalisation mTORC1, qui de façon indirecte contrôle le cycle donneur de résidus méthyl S-Adenosyl-L-homocysteine (SAH)/ S-adenosylmethionine (SAM)<sup>467</sup>. Ces études complexifient singulièrement la compréhension et l'analyse de la régulation de la traduction en contexte *IDHm*. Ces aspects devront être clarifiés.

---

# **5. Bibliographie**

---



1. Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Comp Physiol*. December 1963;62(3):327–336.
2. Velten L, Haas SF, Raffel S, Blaszkiewicz S, Islam S, Hennig BP, et al. Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process. *Nat Cell Biol*. April 2017;19(4):271–281.
3. Doulatov S, Notta F, Eppert K, Nguyen LT, Ohashi PS, Dick JE. Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat Immunol*. July 2010;11(7):585–593.
4. Cabezas-Wallscheid N, Klimmeck D, Hansson J, Lipka DB, Reyes A, Wang Q, et al. Identification of Regulatory Networks in HSCs and Their Immediate Progeny via Integrated Proteome, Transcriptome, and DNA Methylome Analysis. *Cell Stem Cell*. October 2, 2014;15(4):507–522.
5. Carrelha J, Meng Y, Kettle LM, Luis TC, Norfo R, Alcolea V, et al. Hierarchically related lineage-restricted fates of multipotent haematopoietic stem cells. *Nature*. February 2018;554(7690):106–111.
6. Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, et al. Hematopoietic Stem Cells Reversibly Switch from Dormancy to Self-Renewal during Homeostasis and Repair. *Cell*. December 2008;135(6):1118–1129.
7. Hoppe PS, Schwarzfischer M, Loeffler D, Kokkaliaris KD, Hilsenbeck O, Moritz N, et al. Early myeloid lineage choice is not initiated by random PU.1 to GATA1 protein ratios. *Nature*. July 14, 2016;535(7611):299–302.
8. Kayser S, Levis MJ. Advances in Targeted Therapy for Acute Myeloid Leukaemia. *Br J Haematol*. February 2018;180(4):484–500.
9. Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, Lehmann S, Möllgård L, Stockelberg D, et al. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood*. April 30, 2009;113(18):4179–4187.
10. Schlenk RF, Döhner H. Genomic applications in the clinic: use in treatment paradigm of acute myeloid leukemia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:324–330.
11. Schiffer CA, Stone RM. Morphologic Classification and Clinical and Laboratory Correlates. *Holl-Frei Cancer Med 6th Ed*. 2003 [cited August 5, 2022]; Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13452/>
12. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, et al. Recurring Mutations Found by Sequencing an Acute Myeloid Leukemia Genome. *N Engl J Med*. September 10, 2009;361(11):1058–1066.
13. Khwaja A, Bjorkholm M, Gale RE, Levine RL, Jordan CT, Ehninger G, et al. Acute myeloid leukaemia. *Nat Rev Dis Primer*. March 10, 2016;2:16010.
14. Kishtagari A, Levine RL, Viny AD. Driver mutations in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol*. March 2020;27(2):49–57.
15. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. March 22, 2012;366(12):1079–1089.
16. Cancer Genome Atlas Research Network, Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. May 30, 2013;368(22):2059–2074.
17. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. June 9, 2016;374(23):2209–2221.
18. Götze KS, Lengerke C. [Importance of clonal hematopoiesis for hematologic neoplasms]. *Inn Med Heidelb Ger*. September 20, 2022;
19. Testa U, Castelli G, Pelosi E. Clonal Hematopoiesis: Role in Hematologic and Non-

- Hematologic Malignancies. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2022;14(1):e2022069.
20. Danlos F-X, Papo M, Micol J-B. L'hématopoïèse clonale : un concept émergent à la croisée des spécialités. *Rev Médecine Interne*. October 2019;40(10):684–692.
  21. Gao T, Ptashkin R, Bolton KL, Sirenko M, Fong C, Spitzer B, et al. Interplay between chromosomal alterations and gene mutations shapes the evolutionary trajectory of clonal hematopoiesis. *Nat Commun*. January 12, 2021;12(1):338.
  22. Niroula A, Sekar A, Murakami MA, Trinder M, Agrawal M, Wong WJ, et al. Distinction of lymphoid and myeloid clonal hematopoiesis. *Nat Med*. November 2021;27(11):1921–1927.
  23. Stauber J, Grealley JM, Steidl U. Preleukemic and leukemic evolution at the stem cell level. *Blood*. February 25, 2021;137(8):1013–1018.
  24. Abelson S, Collord G, Ng SWK, Weissbrod O, Mendelson Cohen N, Niemeyer E, et al. Prediction of acute myeloid leukaemia risk in healthy individuals. *Nature*. July 2018;559(7714):400–404.
  25. Evans MA, Sano S, Walsh K. Cardiovascular Disease, Aging, and Clonal Hematopoiesis. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. January 24, 2020;15(1):419–438.
  26. Bonnefond A, Skrobek B, Lobbens S, Eury E, Thuillier D, Cauchi S, et al. Association between large detectable clonal mosaicism and type 2 diabetes with vascular complications. *Nat Genet*. September 2013;45(9):1040–1043.
  27. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *N Engl J Med*. December 25, 2014;371(26):2488–2498.
  28. Gibson CJ, Lindsley RC, Tchekmedyian V, Mar BG, Shi J, Jaiswal S, et al. Clonal Hematopoiesis Associated With Adverse Outcomes After Autologous Stem-Cell Transplantation for Lymphoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. May 10, 2017;35(14):1598–1605.
  29. Coombs CC, Zehir A, Devlin SM, Kishtagari A, Syed A, Jonsson P, et al. Therapy-related clonal hematopoiesis in patients with non-hematologic cancers is common and impacts clinical outcome. *Cell Stem Cell*. September 7, 2017;21(3):374–382.e4.
  30. Takahashi K, Wang F, Kantarjian H, Doss D, Khanna K, Thompson E, et al. Pre-leukemic clonal hematopoiesis and the risk of therapy-related myeloid neoplasms: a case-control study. *Lancet Oncol*. January 2017;18(1):100–111.
  31. Gillis NK, Ball M, Zhang Q, Ma Z, Zhao Y, Yoder SJ, et al. Clonal haemopoiesis and therapy-related myeloid malignancies in elderly patients: a proof-of-concept, case-control study. *Lancet Oncol*. January 2017;18(1):112–121.
  32. Ferrando AA, López-Otín C. Clonal evolution in leukemia. *Nat Med*. October 2017;23(10):1135–1145.
  33. Thomas D, Majeti R. Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood*. March 23, 2017;129(12):1577–1585.
  34. Gaidzik V, Döhner K. Prognostic implications of gene mutations in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Semin Oncol*. August 2008;35(4):346–355.
  35. Stavropoulou V, Kaspar S, Brault L, Sanders MA, Juge S, Morettini S, et al. MLL-AF9 Expression in Hematopoietic Stem Cells Drives a Highly Invasive AML Expressing EMT-Related Genes Linked to Poor Outcome. *Cancer Cell*. July 11, 2016;30(1):43–58.
  36. Lagadinou ED, Sach A, Callahan K, Rossi RM, Neering SJ, Minhajuddin M, et al. BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells. *Cell Stem Cell*. March 7, 2013;12(3):329–341.
  37. Adane B, Ye H, Khan N, Pei S, Minhajuddin M, Stevens BM, et al. The Hematopoietic Oxidase NOX2 Regulates Self-Renewal of Leukemic Stem Cells. *Cell Rep*. April 2, 2019;27(1):238–254.e6.
  38. Pei S, Minhajuddin M, Adane B, Khan N, Stevens BM, Mack SC, et al. AMPK/FIS1-

- mediated mitophagy is required for self-renewal of human AML stem cells. *Cell Stem Cell*. July 5, 2018;23(1):86-100.e6.
39. Yamashita M, Dellorusso PV, Olson OC, Passegué E. Dysregulated haematopoietic stem cell behaviour in myeloid leukaemogenesis. *Nat Rev Cancer*. July 2020;20(7):365–382.
  40. Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y, Hijikata A, Kitamura H, Tanaka S, et al. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nat Biotechnol*. November 2007;25(11):1315–1321.
  41. Rao RC, Dou Y. Hijacked in cancer: the MLL/KMT2 family of methyltransferases. *Nat Rev Cancer*. June 2015;15(6):334–346.
  42. Abdel-Wahab O, Adli M, LaFave LM, Gao J, Hricik T, Shih AH, et al. ASXL1 Mutations Promote Myeloid Transformation Through Loss of PRC2-Mediated Gene Repression. *Cancer Cell*. August 14, 2012;22(2):180–193.
  43. Basheer F, Giotopoulos G, Meduri E, Yun H, Mazan M, Sasca D, et al. Contrasting requirements during disease evolution identify EZH2 as a therapeutic target in AML. *J Exp Med*. April 1, 2019;216(4):966–981.
  44. Venney D, Mohd-Sarip A, Mills KI. The Impact of Epigenetic Modifications in Myeloid Malignancies. *Int J Mol Sci*. May 9, 2021;22(9):5013.
  45. Harris WJ, Huang X, Lynch JT, Spencer GJ, Hitchin JR, Li Y, et al. The histone demethylase KDM1A sustains the oncogenic potential of MLL-AF9 leukemia stem cells. *Cancer Cell*. April 17, 2012;21(4):473–487.
  46. Vu LP, Pickering BF, Cheng Y, Zaccara S, Nguyen D, Minuesa G, et al. The N6-methyladenosine (m6A)-forming enzyme METTL3 controls myeloid differentiation of normal and leukemia cells. *Nat Med*. November 2017;23(11):1369–1376.
  47. Barbieri I, Tzelepis K, Pandolfini L, Shi J, Millán-Zambrano G, Robson SC, et al. Promoter-bound METTL3 maintains myeloid leukaemia via m6A-dependent translation control. *Nature*. December 7, 2017;552(7683):126–131.
  48. Prada-Arismendy J, Arroyave JC, Röthlisberger S. Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. *Blood Rev*. January 2017;31(1):63–76.
  49. Zheng X, Gong Y. Functions of RNA N6-methyladenosine modification in acute myeloid leukemia. *Biomark Res*. December 2021;9(1):36.
  50. Visconte V, O Nakashima M, J Rogers H. Mutations in Splicing Factor Genes in Myeloid Malignancies: Significance and Impact on Clinical Features. *Cancers*. November 22, 2019;11(12):E1844.
  51. Ng SWK, Mitchell A, Kennedy JA, Chen WC, McLeod J, Ibrahimova N, et al. A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. *Nature*. December 15, 2016;540(7633):433–437.
  52. Wang Y-H, Lin C-C, Yao C-Y, Hsu C-L, Hou H-A, Tsai C-H, et al. A 4-gene leukemic stem cell score can independently predict the prognosis of myelodysplastic syndrome patients. *Blood Adv*. February 25, 2020;4(4):644–654.
  53. Rampal R, Alkalin A, Madzo J, Vasanthakumar A, Pronier E, Patel J, et al. DNA hydroxymethylation profiling reveals that WT1 mutations result in loss of TET2 function in acute myeloid leukemia. *Cell Rep*. December 11, 2014;9(5):1841–1855.
  54. Wang Y, Xiao M, Chen X, Chen L, Xu Y, Lv L, et al. WT1 recruits TET2 to regulate its target gene expression and suppress leukemia cell proliferation. *Mol Cell*. February 19, 2015;57(4):662–673.
  55. Brunetti L, Gundry MC, Goodell MA. DNMT3A in Leukemia. *Cold Spring Harb Perspect Med*. February 2017;7(2):a030320.
  56. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. January 2000;100(1):57–70.
  57. DeBerardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv*. May

2016;2(5):e1600200.

58. Counihan JL, Grossman EA, Nomura DK. Cancer Metabolism: Current Understanding and Therapies. *Chem Rev.* July 25, 2018;118(14):6893–6923.
59. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* May 22, 2009;324(5930):1029–1033.
60. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer.* May 2011;11(5):325–337.
61. Woodford MR, Baker-Williams AJ, Sager RA, Backe SJ, Blanden AR, Hashmi F, et al. The tumor suppressor folliculin inhibits lactate dehydrogenase A and regulates the Warburg effect. *Nat Struct Mol Biol.* August 2021;28(8):662–670.
62. Jin L, Zhou Y. Crucial role of the pentose phosphate pathway in malignant tumors. *Oncol Lett.* May 2019;17(5):4213–4221.
63. Kreitz J, Schönfeld C, Seibert M, Stolp V, Alshamleh I, Oellerich T, et al. Metabolic Plasticity of Acute Myeloid Leukemia. *Cells.* July 31, 2019;8(8):805.
64. Hirschey MD, DeBerardinis RJ, Diehl AME, Drew JE, Frezza C, Green MF, et al. Dysregulated metabolism contributes to oncogenesis. *Semin Cancer Biol.* December 2015;35 Suppl:S129–S150.
65. Hay N. Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nat Rev Cancer.* October 2016;16(10):635–649.
66. Poulain L, Sujobert P, Zylbersztejn F, Barreau S, Stuani L, Lambert M, et al. High mTORC1 activity drives glycolysis addiction and sensitivity to G6PD inhibition in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia.* November 2017;31(11):2326–2335.
67. 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.* November 2015;17(5):585–596.
68. Ju H-Q, Zhan G, Huang A, Sun Y, Wen S, Yang J, et al. ITD mutation in FLT3 tyrosine kinase promotes Warburg effect and renders therapeutic sensitivity to glycolytic inhibition. *Leukemia.* October 2017;31(10):2143–2150.
69. Watson A, Riffelmacher T, Stranks A, Williams O, De Boer J, Cain K, et al. Autophagy limits proliferation and glycolytic metabolism in acute myeloid leukemia. *Cell Death Discov.* December 2015;1(1):15008.
70. Allegretti M, Ricciardi MR, Licchetta R, Mirabilii S, Orecchioni S, Reggiani F, et al. The pan-class I phosphatidylinositol-3 kinase inhibitor NVP-BKM120 demonstrates anti-leukemic activity in acute myeloid leukemia. *Sci Rep.* December 17, 2015;5:18137.
71. Yun J, Rago C, Cheong I, Pagliarini R, Angenendt P, Rajagopalan H, et al. Glucose Deprivation Contributes to the Development of KRAS Pathway Mutations in Tumor Cells. *Science.* September 18, 2009;325(5947):1555–1559.
72. Barthel A, Okino ST, Liao J, Nakatani K, Li J, Whitlock JP, et al. Regulation of GLUT1 Gene Transcription by the Serine/Threonine Kinase Akt1. *J Biol Chem.* July 1999;274(29):20281–20286.
73. Song K, Li M, Xu X, Xuan L, Huang G, Liu Q. Resistance to chemotherapy is associated with altered glucose metabolism in acute myeloid leukemia. *Oncol Lett.* July 2016;12(1):334–342.
74. Ye H, Adane B, Khan N, Alexeev E, Nusbacher N, Minhajuddin M, et al. Subversion of Systemic Glucose Metabolism as a Mechanism to Support the Growth of Leukemia Cells. *Cancer Cell.* October 8, 2018;34(4):659–673.e6.
75. Chen Y, Xu Q, Ji D, Wei Y, Chen H, Li T, et al. Inhibition of pentose phosphate pathway suppresses acute myelogenous leukemia. *Tumor Biol.* May 2016;37(5):6027–6034.
76. Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, et

- al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*. March 2008;452(7184):230–233.
77. Wang Y-H, Israelsen WJ, Lee D, Yu VWC, Jeanson NT, Clish CB, et al. Cell-state-specific metabolic dependency in hematopoiesis and leukemogenesis. *Cell*. September 11, 2014;158(6):1309–1323.
78. He L, Luo L, Proctor SJ, Middleton PG, Blakely EL, Taylor RW, et al. Somatic mitochondrial DNA mutations in adult-onset leukaemia. *Leukemia*. December 1, 2003;17(12):2487–2491.
79. Silkjaer T, Nørgaard JM, Aggerholm A, Ebbesen LH, Kjeldsen E, Hokland P, et al. Characterization and prognostic significance of mitochondrial DNA variations in acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol*. May 2013;90(5):385–396.
80. Liyanage SU, Hurren R, Voisin V, Bridon G, Wang X, Xu C, et al. Leveraging increased cytoplasmic nucleoside kinase activity to target mtDNA and oxidative phosphorylation in AML. *Blood*. May 11, 2017;129(19):2657–2666.
81. Skrtić M, Sriskanthadevan S, Jhas B, Gebbia M, Wang X, Wang Z, et al. Inhibition of mitochondrial translation as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. November 15, 2011;20(5):674–688.
82. Sriskanthadevan S, Jeyaraju DV, Chung TE, Prabha S, Xu W, Skrtic M, et al. AML cells have low spare reserve capacity in their respiratory chain that renders them susceptible to oxidative metabolic stress. *Blood*. March 26, 2015;125(13):2120–2130.
83. Molina JR, Sun Y, Protopopova M, Gera S, Bandi M, Bristow C, et al. An inhibitor of oxidative phosphorylation exploits cancer vulnerability. *Nat Med*. July 2018;24(7):1036–1046.
84. Nii T, Prabhu VV, Ruvolo V, Madhukar N, Zhao R, Mu H, et al. Imipridone ONC212 activates orphan G protein-coupled receptor GPR132 and integrated stress response in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. December 2019;33(12):2805–2816.
85. Cole A, Wang Z, Coyaud E, Voisin V, Gronda M, Jitkova Y, et al. Inhibition of the Mitochondrial Protease ClpP as a Therapeutic Strategy for Human Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell*. June 8, 2015;27(6):864–876.
86. Ito K, Suda T. Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. April 2014;15(4):243–256.
87. Takubo K, Goda N, Yamada W, Iriuchishima H, Ikeda E, Kubota Y, et al. Regulation of the HIF-1 $\alpha$  level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. September 3, 2010;7(3):391–402.
88. Simsek T, Kocabas F, Zheng J, DeBerardinis RJ, Mahmoud AI, Olson EN, et al. The Distinct Metabolic Profile of Hematopoietic Stem Cells Reflects Their Location in a Hypoxic Niche. *Cell Stem Cell*. September 2010;7(3):380–390.
89. Miyamoto K, Araki KY, Naka K, Arai F, Takubo K, Yamazaki S, et al. Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell*. June 7, 2007;1(1):101–112.
90. Anonymous Reviewer, Topisirovic I, Cheah KSE. Decision letter: Intrinsic OXPHOS limitations underlie cellular bioenergetics in leukemia [Internet]. [cited October 17, 2022]. Available at: <https://elifesciences.org/articles/63104#sa1>
91. Samimi A, Kalantari H, Lorestani MZ, Shirzad R, Saki N. Oxidative stress in normal hematopoietic stem cells and leukemia. *APMIS*. April 2018;126(4):284–294.
92. Zhou F, Shen Q, Claret FX. Novel roles of reactive oxygen species in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *J Leukoc Biol*. September 2013;94(3):423–429.
93. Sallmyr A, Fan J, Datta K, Kim K-T, Grosu D, Shapiro P, et al. Internal tandem duplication of FLT3 (FLT3/ITD) induces increased ROS production, DNA damage, and misrepair: implications for poor prognosis in AML. *Blood*. March 15, 2008;111(6):3173–3182.

94. Hole PS, Zabkiewicz J, Munje C, Newton Z, Pearn L, White P, et al. Overproduction of NOX-derived ROS in AML promotes proliferation and is associated with defective oxidative stress signaling. *Blood*. November 7, 2013;122(19):3322–3330.
95. Jones CL, Stevens BM, D'Alessandro A, Reisz JA, Culp-Hill R, Nemkov T, et al. Inhibition of Amino Acid Metabolism Selectively Targets Human Leukemia Stem Cells. *Cancer Cell*. November 12, 2018;34(5):724–740.e4.
96. Pollyea DA, Stevens BM, Jones CL, Winters A, Pei S, Minhajuddin M, et al. Venetoclax with azacitidine disrupts energy metabolism and targets leukemia stem cells in patients with acute myeloid leukemia. *Nat Med*. December 2018;24(12):1859–1866.
97. Jones CL, Stevens BM, Culp-Hill R, Dalessandro A, Krug A, Goosman M, et al. Inhibition of Fatty Acid Metabolism Re-Sensitizes Resistant Leukemia Stem Cells to Venetoclax with Azacitidine. *Blood*. November 13, 2019;134(Supplement\_1):1272–1272.
98. Giordano A, Calvani M, Petillo O, Grippo P, Tuccillo F, Melone M a. B, et al. tBid induces alterations of mitochondrial fatty acid oxidation flux by malonyl-CoA-independent inhibition of carnitine palmitoyltransferase-1. *Cell Death Differ*. June 2005;12(6):603–613.
99. Paumen MB, Ishida Y, Han H, Muramatsu M, Eguchi Y, Tsujimoto Y, et al. Direct Interaction of the Mitochondrial Membrane Protein Carnitine Palmitoyltransferase I with Bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun*. February 1997;231(3):523–525.
100. Guerra VA, DiNardo C, Konopleva M. Venetoclax-based therapies for acute myeloid leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. June 2019;32(2):145–153.
101. DiNardo CD, Pratz K, Pullarkat V, Jonas BA, Arellano M, Becker PS, et al. Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naive, elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. January 3, 2019;133(1):7–17.
102. DiNardo CD, Jonas BA, Pullarkat V, Thirman MJ, Garcia JS, Wei AH, et al. Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. August 13, 2020;383(7):617–629.
103. McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem*. February 15, 1997;244(1):1–14.
104. Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol*. September 2011;13(9):1016–1023.
105. Qu Q, Zeng F, Liu X, Wang QJ, Deng F. Fatty acid oxidation and carnitine palmitoyltransferase I: emerging therapeutic targets in cancer. *Cell Death Dis*. May 19, 2016;7:e2226.
106. Stuani L, Sabatier M, Sarry J-E. Exploiting metabolic vulnerabilities for personalized therapy in acute myeloid leukemia. *BMC Biol*. December 2019;17(1):57.
107. Currie E, Schulze A, Zechner R, Walther TC, Farese RV. Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell Metab*. August 6, 2013;18(2):153–161.
108. Southam AD, Khanim FL, Hayden RE, Constantinou JK, Koczula KM, Michell RH, et al. Drug Redeployment to Kill Leukemia and Lymphoma Cells by Disrupting SCD1-Mediated Synthesis of Monounsaturated Fatty Acids. *Cancer Res*. June 15, 2015;75(12):2530–2540.
109. Murray JA, Khanim FL, Hayden RE, Craddock CF, Holyoake TL, Jackson N, et al. Combined bezafibrate and medroxyprogesterone acetate have efficacy without haematological toxicity in elderly and relapsed acute myeloid leukaemia (AML). *Br J Haematol*. April 2010;149(1):65–69.
110. Khanim FL, Hayden RE, Birtwistle J, Lodi A, Tiziani S, Davies NJ, et al. Combined bezafibrate and medroxyprogesterone acetate: potential novel therapy for acute myeloid leukaemia. *PloS One*. December 7, 2009;4(12):e8147.
111. Yusuf RZ, Saez B, Sharda A, van Gastel N, Yu VWC, Baryawno N, et al. Aldehyde dehydrogenase 3a2 protects AML cells from oxidative death and the synthetic lethality of ferroptosis inducers. *Blood*. September 10, 2020;136(11):1303–1316.
112. Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, Bush AI, Conrad M, Dixon SJ, et al.

- Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell*. October 5, 2017;171(2):273–285.
113. Zhang Y, Swanda RV, Nie L, Liu X, Wang C, Lee H, et al. mTORC1 couples cyst(e)ine availability with GPX4 protein synthesis and ferroptosis regulation. *Nat Commun*. March 11, 2021;12(1):1589.
  114. Samudio I, Harmancey R, Fiegl M, Kantarjian H, Konopleva M, Korchin B, et al. Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *J Clin Invest*. January 4, 2010;120(1):142–156.
  115. Boroughs LK, DeBerardinis RJ. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nat Cell Biol*. April 2015;17(4):351–359.
  116. Nieman KM, Kenny HA, Penicka CV, Ladanyi A, Buell-Gutbrod R, Zillhardt MR, et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med*. November 2011;17(11):1498–1503.
  117. Carmen G-Y, Víctor S-M. Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cell Signal*. April 2006;18(4):401–408.
  118. Sengenès C, Bouloumié A, Hauner H, Berlan M, Busse R, Lafontan M, et al. Involvement of a cGMP-dependent Pathway in the Natriuretic Peptide-mediated Hormone-sensitive Lipase Phosphorylation in Human Adipocytes. *J Biol Chem*. December 2003;278(49):48617–48626.
  119. Brasaemle DL, Subramanian V, Garcia A, Marcinkiewicz A, Rothenberg A. Perilipin A and the control of triacylglycerol metabolism. *Mol Cell Biochem*. June 2009;326(1–2):15–21.
  120. Shafat MS, Oellerich T, Mohr S, Robinson SD, Edwards DR, Marlein CR, et al. Leukemic blasts program bone marrow adipocytes to generate a protumoral microenvironment. *Blood*. March 9, 2017;129(10):1320–1332.
  121. Itoh T, Fairall L, Amin K, Inaba Y, Szanto A, Balint BL, et al. Structural basis for the activation of PPAR $\gamma$  by oxidized fatty acids. *Nat Struct Mol Biol*. September 2008;15(9):924–931.
  122. Chi T, Wang M, Wang X, Yang K, Xie F, Liao Z, et al. PPAR- $\gamma$  Modulators as Current and Potential Cancer Treatments. *Front Oncol*. September 23, 2021;11:737776.
  123. Ye H, Adane B, Khan N, Sullivan T, Minhajuddin M, Gasparetto M, et al. Leukemic Stem Cells Evade Chemotherapy by Metabolic Adaptation to an Adipose Tissue Niche. *Cell Stem Cell*. July 2016;19(1):23–37.
  124. Tabe Y, Konopleva M, Andreeff M. Fatty Acid Metabolism, Bone Marrow Adipocytes, and AML. *Front Oncol*. February 18, 2020;10:155.
  125. Ricciardi MR, Mirabilii S, Allegretti M, Licchetta R, Calarco A, Torrisi MR, et al. Targeting the leukemia cell metabolism by the CPT1a inhibition: functional preclinical effects in leukemias. *Blood*. October 15, 2015;126(16):1925–1929.
  126. Tabe Y, Saitoh K, Yang H, Sekihara K, Yamatani K, Ruvolo V, et al. Inhibition of FAO in AML co-cultured with BM adipocytes: mechanisms of survival and chemosensitization to cytarabine. *Sci Rep*. December 2018;8(1):16837.
  127. Wu Y, Hurren R, MacLean N, Gronda M, Jitkova Y, Sukhai MA, et al. Carnitine transporter CT2 (SLC22A16) is over-expressed in acute myeloid leukemia (AML) and target knockdown reduces growth and viability of AML cells. *Apoptosis Int J Program Cell Death*. August 2015;20(8):1099–1108.
  128. Tcheng M, Roma A, Ahmed N, Smith RW, Jayanth P, Minden MD, et al. Very long chain fatty acid metabolism is required in acute myeloid leukemia. *Blood*. June 24, 2021;137(25):3518–3532.
  129. Tabe Y, Lorenzi PL, Konopleva M. Amino acid metabolism in hematologic malignancies and the era of targeted therapy. *Blood*. September 26, 2019;134(13):1014–1023.

130. Patil MD, Bhaumik J, Babykutty S, Banerjee UC, Fukumura D. Arginine dependence of tumor cells: targeting a chink in cancer's armor. *Oncogene*. September 22, 2016;35(38):4957–4972.
131. Pervin S, Singh R, Hernandez E, Wu G, Chaudhuri G. Nitric oxide in physiologic concentrations targets the translational machinery to increase the proliferation of human breast cancer cells: involvement of mammalian target of rapamycin/eIF4E pathway. *Cancer Res*. January 1, 2007;67(1):289–299.
132. Mussai F, Egan S, Higginbotham-Jones J, Perry T, Beggs A, Odintsova E, et al. Arginine dependence of acute myeloid leukemia blast proliferation: a novel therapeutic target. *Blood*. April 9, 2015;125(15):2386–2396.
133. Wang Y, Zhang L, Chen W-L, Wang J-H, Li N, Li J-M, et al. Rapid diagnosis and prognosis of de novo acute myeloid leukemia by serum metabolomic analysis. *J Proteome Res*. October 4, 2013;12(10):4393–4401.
134. Miraki-Moud F, Ghazaly E, Ariza-McNaughton L, Hodby KA, Clear A, Anjos-Afonso F, et al. Arginine deprivation using pegylated arginine deiminase has activity against primary acute myeloid leukemia cells in vivo. *Blood*. June 25, 2015;125(26):4060–4068.
135. Tsai H-J, Jiang SS, Hung W-C, Borthakur G, Lin S-F, Pemmaraju N, et al. A Phase II Study of Arginine Deiminase (ADI-PEG20) in Relapsed/Refractory or Poor-Risk Acute Myeloid Leukemia Patients. *Sci Rep*. September 12, 2017;7(1):11253.
136. Jones CL, Stevens BM, D'Alessandro A, Culp-Hill R, Reisz JA, Pei S, et al. Cysteine depletion targets leukemia stem cells through inhibition of electron transport complex II. *Blood*. July 25, 2019;134(4):389–394.
137. Matre P, Velez J, Jacamo R, Qi Y, Su X, Cai T, et al. Inhibiting glutaminase in acute myeloid leukemia: metabolic dependency of selected AML subtypes. *Oncotarget*. November 29, 2016;7(48):79722–79735.
138. Brosnan JT. Interorgan amino acid transport and its regulation. *J Nutr*. June 2003;133(6 Suppl 1):2068S-2072S.
139. Anderson NM, Mucka P, Kern JG, Feng H. The emerging role and targetability of the TCA cycle in cancer metabolism. *Protein Cell*. February 2018;9(2):216–237.
140. Willems L, Jacque N, Jacquelin A, Neveux N, Maciel TT, Lambert M, et al. Inhibiting glutamine uptake represents an attractive new strategy for treating acute myeloid leukemia. *Blood*. November 14, 2013;122(20):3521–3532.
141. Jacque N, Ronchetti AM, Larrue C, Meunier G, Birsén R, Willems L, et al. Targeting glutaminolysis has antileukemic activity in acute myeloid leukemia and synergizes with BCL-2 inhibition. *Blood*. September 10, 2015;126(11):1346–1356.
142. Gregory MA, Nemkov T, Park HJ, Zaberezhnyy V, Gehrke S, Adane B, et al. Targeting Glutamine Metabolism and Redox State for Leukemia Therapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. July 1, 2019;25(13):4079–4090.
143. Emadi A, Jun SA, Tsukamoto T, Fathi AT, Minden MD, Dang CV. Inhibition of glutaminase selectively suppresses the growth of primary acute myeloid leukemia cells with IDH mutations. *Exp Hematol*. April 2014;42(4):247–251.
144. Nicklin P, Bergman P, Zhang B, Triantafellow E, Wang H, Nyfeler B, et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell*. February 6, 2009;136(3):521–534.
145. Alessi DR, Sakamoto K, Bayascas JR. LKB1-Dependent Signaling Pathways. *Annu Rev Biochem*. June 1, 2006;75(1):137–163.
146. Buzzai M, Jones RG, Amaravadi RK, Lum JJ, DeBerardinis RJ, Zhao F, et al. Systemic Treatment with the Antidiabetic Drug Metformin Selectively Impairs p53-Deficient Tumor Cell Growth. *Cancer Res*. July 15, 2007;67(14):6745–6752.
147. Gan B, Hu J, Jiang S, Liu Y, Sahin E, Zhuang L, et al. Lkb1 regulates quiescence and metabolic homeostasis of haematopoietic stem cells. *Nature*. December 2,



2010;468(7324):701–704.

148. Wang H, Wang X, Xin N, Qi L, Liao A, Yang W, et al. Live kinase B1 maintains CD34+CD38– AML cell proliferation and self-renewal. *Mol Cell Biochem*. October 2017;434(1–2):25–32.

149. Clemens MJ. Targets and mechanisms for the regulation of translation in malignant transformation. *Oncogene*. April 19, 2004;23(18):3180–3188.

150. Pullen N, Dennis PB, Andjelkovic M, Dufner A, Kozma SC, Hemmings BA, et al. Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science*. January 30, 1998;279(5351):707–710.

151. De Benedetti A, Graff JR. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene*. April 19, 2004;23(18):3189–3199.

152. Gingras A-C, Raught B, Sonenberg N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev*. April 1, 2001;15(7):807–826.

153. Wang X, Yue P, Chan C-B, Ye K, Ueda T, Watanabe-Fukunaga R, et al. Inhibition of Mammalian Target of Rapamycin Induces Phosphatidylinositol 3-Kinase-Dependent and Mnk-Mediated Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Phosphorylation. *Mol Cell Biol*. November 2007;27(21):7405–7413.

154. Pirozzi CJ, Yan H. The implications of IDH mutations for cancer development and therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. October 2021;18(10):645–661.

155. Welch JS, Ley TJ, Link DC, Miller CA, Larson DE, Koboldt DC, et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell*. July 20, 2012;150(2):264–278.

156. Marcucci G, Maharry K, Wu Y-Z, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, et al. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. May 10, 2010;28(14):2348–2355.

157. Desai P, Mencia-Trinchant N, Savenkov O, Simon MS, Cheang G, Lee S, et al. Somatic mutations precede acute myeloid leukemia years before diagnosis. *Nat Med*. July 2018;24(7):1015–1023.

158. Yoshimi A, Lin K-T, Wiseman DH, Rahman MA, Pastore A, Wang B, et al. Coordinated alterations in RNA splicing and epigenetic regulation drive leukaemogenesis. *Nature*. October 2019;574(7777):273–277.

159. Zhang X, Wang X, Wang XQD, Su J, Putluri N, Zhou T, et al. Dnmt3a loss and Idh2 neomorphic mutations mutually potentiate malignant hematopoiesis. *Blood*. March 12, 2020;135(11):845–856.

160. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJP. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood*. January 7, 2016;127(1):29–41.

161. Alzial G, Renoult O, Paris F, Gratas C, Clavreul A, Pecqueur C. Wild-type isocitrate dehydrogenase under the spotlight in glioblastoma. *Oncogene*. January 2022;41(5):613–621.

162. Bergaggio E, Piva R. Wild-Type IDH Enzymes as Actionable Targets for Cancer Therapy. *Cancers*. April 19, 2019;11(4):563.

163. Ma T, Peng Y, Huang W, Liu Y, Ding J. The  $\beta$  and  $\gamma$  subunits play distinct functional roles in the  $\alpha 2\beta\gamma$  heterotetramer of human NAD-dependent isocitrate dehydrogenase. *Sci Rep*. March 2017;7(1):41882.

164. Taylor AB, Hu G, Hart PJ, McAlister-Henn L. Allosteric Motions in Structures of Yeast NAD<sup>+</sup>-specific Isocitrate Dehydrogenase. *J Biol Chem*. April 2008;283(16):10872–10880.

165. Xu Y, Liu L, Nakamura A, Someya S, Miyakawa T, Tanokura M. Studies on the regulatory mechanism of isocitrate dehydrogenase 2 using acetylation mimics. *Sci Rep*. December 2017;7(1):9785.

166. Xu X, Zhao J, Xu Z, Peng B, Huang Q, Arnold E, et al. Structures of Human Cytosolic NADP-dependent Isocitrate Dehydrogenase Reveal a Novel Self-regulatory

- Mechanism of Activity. *J Biol Chem*. August 2004;279(32):33946–33957.
167. Ceccarelli C, Grodsky NB, Ariyaratne N, Colman RF, Bahnson BJ. Crystal Structure of Porcine Mitochondrial NADP<sup>+</sup>-dependent Isocitrate Dehydrogenase Complexed with Mn<sup>2+</sup> and Isocitrate. *J Biol Chem*. November 2002;277(45):43454–43462.
168. Reitman ZJ, Yan H. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. *J Natl Cancer Inst*. July 7, 2010;102(13):932–941.
169. Cupp JR, McAlister-Henn L. Cloning and characterization of the gene encoding the IDH1 subunit of NAD(+) -dependent isocitrate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. August 15, 1992;267(23):16417–16423.
170. Panisko EA, McAlister-Henn L. Subunit Interactions of Yeast NAD<sup>+</sup>-specific Isocitrate Dehydrogenase. *J Biol Chem*. January 2001;276(2):1204–1210.
171. Chandel NS. Evolution of Mitochondria as Signaling Organelles. *Cell Metab*. August 2015;22(2):204–206.
172. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat Commun*. January 3, 2020;11(1):102.
173. Mailloux RJ, Bériault R, Lemire J, Singh R, Chénier DR, Hamel RD, et al. The tricarboxylic acid cycle, an ancient metabolic network with a novel twist. *PLoS One*. August 1, 2007;2(8):e690.
174. Legendre F, MacLean A, Appanna VP, Appanna VD. Biochemical pathways to  $\alpha$ -ketoglutarate, a multi-faceted metabolite. *World J Microbiol Biotechnol*. August 2020;36(8):123.
175. Koh H-J, Lee S-M, Son B-G, Lee S-H, Ryoo ZY, Chang K-T, et al. Cytosolic NADP<sup>+</sup>-dependent Isocitrate Dehydrogenase Plays a Key Role in Lipid Metabolism. *J Biol Chem*. September 2004;279(38):39968–39974.
176. Nam WS, Park KM, Park J-W. RNA interference targeting cytosolic NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase exerts anti-obesity effect in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. August 2012;1822(8):1181–1188.
177. Ronnebaum SM, Ilkayeva O, Burgess SC, Joseph JW, Lu D, Stevens RD, et al. A Pyruvate Cycling Pathway Involving Cytosolic NADP-dependent Isocitrate Dehydrogenase Regulates Glucose-stimulated Insulin Secretion. *J Biol Chem*. October 2006;281(41):30593–30602.
178. Joseph JW, Jensen MV, Ilkayeva O, Palmieri F, Alárcon C, Rhodes CJ, et al. The Mitochondrial Citrate/Isocitrate Carrier Plays a Regulatory Role in Glucose-stimulated Insulin Secretion. *J Biol Chem*. November 2006;281(47):35624–35632.
179. Bogdanovic E, Sadri A-R, Catapano M, Vance JE, Jeschke MG. IDH1 regulates phospholipid metabolism in developing astrocytes. *Neurosci Lett*. October 2014;582:87–92.
180. Comte B, Vincent G, Bouchard B, Benderdour M, Des Rosiers C. Reverse flux through cardiac NADP<sup>+</sup>-isocitrate dehydrogenase under normoxia and ischemia. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. October 1, 2002;283(4):H1505–H1514.
181. Zangar RC, Davydov DR, Verma S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol*. September 15, 2004;199(3):316–331.
182. Nakamura H. Thioredoxin and Its Related Molecules: Update 2005. *Antioxid Redox Signal*. May 2005;7(5–6):823–828.
183. Van Noorden CJF, Butcher RG. A quantitative histochemical study of NADPH-ferrihemoprotein reductase activity. *Histochem J*. July 1986;18(7):364–370.
184. Winkler BS, DeSantis N, Solomon F. Multiple NADPH-producing pathways control glutathione (GSH) content in retina. *Exp Eye Res*. November 1986;43(5):829–847.
185. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-

- dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj*. May 2013;1830(5):3217–3266.
186. Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem*. November 25, 1988;263(33):17205–17208.
187. Holmgren A, Lu J. Thioredoxin and thioredoxin reductase: Current research with special reference to human disease. *Biochem Biophys Res Commun*. May 2010;396(1):120–124.
188. Kirkman HN, Galiano S, Gaetani GF. The function of catalase-bound NADPH. *J Biol Chem*. January 15, 1987;262(2):660–666.
189. Lee S-M, Park SY, Shin SW, Kil IS, Yang ES, Park J-W. Silencing of cytosolic NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase by small interfering RNA enhances the sensitivity of HeLa cells toward staurosporine. *Free Radic Res*. January 2009;43(2):165–173.
190. Yang J-H, Yang ES, Park J-W. Inactivation of NADP<sup>+</sup>-dependent Isocitrate Dehydrogenase by Lipid Peroxidation Products. *Free Radic Res*. March 2004;38(3):241–249.
191. Mailloux RJ, Lemire J, Appanna VD. Hepatic response to aluminum toxicity: Dyslipidemia and liver diseases. *Exp Cell Res*. October 2011;317(16):2231–2238.
192. Lee SM, Huh T-L, Park J-W. Inactivation of NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase by reactive oxygen species. *Biochimie*. November 2001;83(11–12):1057–1065.
193. Shin SW, Shin SW, Oh CJ, Kil IS, Park J-W. Glutathionylation regulates cytosolic NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase activity. *Free Radic Res*. January 2009;43(4):409–416.
194. Yang ES, Richter C, Chun J-S, Huh T-L, Kang S-S, Park J-W. Inactivation of NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase by nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. October 2002;33(7):927–937.
195. Kil IS, Lee JH, Shin AH, Park J-W. Glycation-induced inactivation of NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase: implications for diabetes and aging. *Free Radic Biol Med*. December 2004;37(11):1765–1778.
196. Lee SM, Koh H-J, Park D-C, Song BJ, Huh T-L, Park J-W. Cytosolic NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells. *Free Radic Biol Med*. June 2002;32(11):1185–1196.
197. Jo S-H, Lee S-H, Suk Chun H, Min Lee S, Koh H-J, Lee S-E, et al. Cellular Defense against UVB-Induced Phototoxicity by Cytosolic NADP<sup>+</sup>-Dependent Isocitrate Dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun*. March 2002;292(2):542–549.
198. Shin SW, Kil IS, Park J-W. Silencing of mitochondrial NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase by small interfering RNA enhances heat shock-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. February 2008;366(4):1012–1018.
199. Kil IS, Kim SY, Lee SJ, Park J-W. Small interfering RNA-mediated silencing of mitochondrial NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase enhances the sensitivity of HeLa cells toward tumor necrosis factor- $\alpha$  and anticancer drugs. *Free Radic Biol Med*. October 2007;43(8):1197–1207.
200. Lee JH, Kim SY, Kil IS, Park J-W. Regulation of Ionizing Radiation-induced Apoptosis by Mitochondrial NADP<sup>+</sup>-dependent Isocitrate Dehydrogenase. *J Biol Chem*. May 2007;282(18):13385–13394.
201. Ying W. NAD<sup>+</sup>/NADH and NADP<sup>+</sup>/NADPH in Cellular Functions and Cell Death: Regulation and Biological Consequences. *Antioxid Redox Signal*. February 2008;10(2):179–206.
202. Radzki RP, Bieńko M, Pierzynowski SG. Effect of dietary alpha-ketoglutarate on blood lipid profile during hypercholesterolaemia in rats. *Scand J Clin Lab Invest*. January 2009;69(2):175–180.

203. Bosoi CR, Rose CF. Identifying the direct effects of ammonia on the brain. *Metab Brain Dis*. March 2009;24(1):95–102.
204. Aldarini N, Alhasawi AA, Thomas SC, Appanna VD. The role of glutamine synthetase in energy production and glutamine metabolism during oxidative stress. *Antonie Van Leeuwenhoek*. May 2017;110(5):629–639.
205. Steffens L, Pettinato E, Steiner TM, Mall A, König S, Eisenreich W, et al. High CO<sub>2</sub> levels drive the TCA cycle backwards towards autotrophy. *Nature*. April 29, 2021;592(7856):784–788.
206. Alhasawi AA, Thomas SC, Tharmalingam S, Legendre F, Appanna VD. Isocitrate Lyase and Succinate Semialdehyde Dehydrogenase Mediate the Synthesis of  $\alpha$ -Ketoglutarate in *Pseudomonas fluorescens*. *Front Microbiol*. August 23, 2019;10:1929.
207. Beer B, Pick A, Sieber V. In vitro metabolic engineering for the production of  $\alpha$ -ketoglutarate. *Metab Eng*. March 2017;40:5–13.
208. Richard P, Hilditch S. d-Galacturonic acid catabolism in microorganisms and its biotechnological relevance. *Appl Microbiol Biotechnol*. March 2009;82(4):597–604.
209. Carey BW, Finley LWS, Cross JR, Allis CD, Thompson CB. Intracellular  $\alpha$ -ketoglutarate maintains the pluripotency of embryonic stem cells. *Nature*. February 2015;518(7539):413–416.
210. Velvizhi S, Dakshayani KB, Subramanian P. Effects of  $\alpha$ -ketoglutarate on antioxidants and lipid peroxidation products in rats treated with ammonium acetate. *Nutrition*. September 2002;18(9):747–750.
211. Lemire J, Alhasawi A, Appanna VP, Tharmalingam S, Appanna VD. Metabolic defence against oxidative stress: the road less travelled so far. *J Appl Microbiol*. October 2017;123(4):798–809.
212. Long LH, Halliwell B. Artefacts in cell culture:  $\alpha$ -Ketoglutarate can scavenge hydrogen peroxide generated by ascorbate and epigallocatechin gallate in cell culture media. *Biochem Biophys Res Commun*. March 2011;406(1):20–24.
213. Bignucolo A, Appanna VP, Thomas SC, Auger C, Han S, Omri A, et al. Hydrogen peroxide stress provokes a metabolic reprogramming in *Pseudomonas fluorescens*: Enhanced production of pyruvate. *J Biotechnol*. September 2013;167(3):309–315.
214. Mailloux RJ, Singh R, Brewer G, Auger C, Lemire J, Appanna VD.  $\alpha$ -Ketoglutarate Dehydrogenase and Glutamate Dehydrogenase Work in Tandem To Modulate the Antioxidant  $\alpha$ -Ketoglutarate during Oxidative Stress in *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol*. June 15, 2009;191(12):3804–3810.
215. Liu S, He L, Yao K. The Antioxidative Function of Alpha-Ketoglutarate and Its Applications. *BioMed Res Int*. 2018;2018:1–6.
216. Selvaraj N, Bobby Z, Das AK, Ramesh R, Koner BC. An evaluation of level of oxidative stress and protein glycation in nondiabetic undialyzed chronic renal failure patients. *Clin Chim Acta*. October 2002;324(1–2):45–50.
217. Losman J-A, Koivunen P, Kaelin WG. 2-Oxoglutarate-dependent dioxygenases in cancer. *Nat Rev Cancer*. December 2020;20(12):710–726.
218. Cimmino L, Dolgalev I, Wang Y, Yoshimi A, Martin GH, Wang J, et al. Restoration of TET2 Function Blocks Aberrant Self-Renewal and Leukemia Progression. *Cell*. September 2017;170(6):1079–1095.e20.
219. Agathocleous M, Meacham CE, Burgess RJ, Piskounova E, Zhao Z, Crane GM, et al. Ascorbate regulates haematopoietic stem cell function and leukaemogenesis. *Nature*. September 28, 2017;549(7673):476–481.
220. Albaugh VL, Mukherjee K, Barbul A. Proline Precursors and Collagen Synthesis: Biochemical Challenges of Nutrient Supplementation and Wound Healing. *J Nutr*. October 4, 2017;jn256404.
221. Bellon G, Chaqour B, Wegrowski Y, Monboisse J-C, Borel J-P. Glutamine increases

- collagen gene transcription in cultured human fibroblasts. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* September 1995;1268(3):311–323.
222. Liu P-S, Wang H, Li X, Chao T, Teav T, Christen S, et al.  $\alpha$ -ketoglutarate orchestrates macrophage activation through metabolic and epigenetic reprogramming. *Nat Immunol.* September 2017;18(9):985–994.
223. Moog S, Lussey-Lepoutre C, Favier J. Epigenetic and metabolic reprogramming of SDH-deficient paragangliomas. *Endocr Relat Cancer.* December 2020;27(12):R451–R463.
224. Tomlinson IPM, Alam NA, Rowan AJ, Barclay E, Jaeger EEM, Kelsell D, et al. Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat Genet.* April 2002;30(4):406–410.
225. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature.* December 10, 2009;462(7274):739–744.
226. Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA, et al. The Common Feature of Leukemia-Associated IDH1 and IDH2 Mutations Is a Neomorphic Enzyme Activity Converting  $\alpha$ -Ketoglutarate to 2-Hydroxyglutarate. *Cancer Cell.* March 2010;17(3):225–234.
227. Janin M, Mylonas E, Saada V, Micol J-B, Renneville A, Quivoron C, 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. *J Clin Oncol.* February 1, 2014;32(4):297–305.
228. DiNardo CD, Propert KJ, Loren AW, Paietta E, Sun Z, Levine RL, et al. Serum 2-hydroxyglutarate levels predict isocitrate dehydrogenase mutations and clinical outcome in acute myeloid leukemia. *Blood.* June 13, 2013;121(24):4917–4924.
229. Willekens C, Renneville A, Broutin S, Saada V, Micol J-B, Delahousse J, et al. Mutational profiling of isolated myeloid sarcomas and utility of serum 2HG as biomarker of IDH1/2 mutations. *Leukemia.* September 2018;32(9):2008–2081.
230. Lemonnier F, Cairns RA, Inoue S, Li WY, Dupuy A, Broutin S, et al. The IDH2 R172K mutation associated with angioimmunoblastic T-cell lymphoma produces 2HG in T cells and impacts lymphoid development. *Proc Natl Acad Sci.* December 27, 2016;113(52):15084–15089.
231. Borger DR, Goyal L, Yau T, Poon RT, Ancukiewicz M, Deshpande V, et al. Circulating Oncometabolite 2-Hydroxyglutarate Is a Potential Surrogate Biomarker in Patients with Isocitrate Dehydrogenase-Mutant Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Clin Cancer Res.* April 1, 2014;20(7):1884–1890.
232. Rzem R, Vincent M-F, Van Schaftingen E, Veiga-da-Cunha M. L-2-Hydroxyglutaric aciduria, a defect of metabolite repair. *J Inherit Metab Dis.* October 2007;30(5):681–689.
233. Intlekofer AM, Wang B, Liu H, Shah H, Carmona-Fontaine C, Rustenburg AS, et al. L-2-Hydroxyglutarate production arises from noncanonical enzyme function at acidic pH. *Nat Chem Biol.* May 2017;13(5):494–500.
234. Zhao X, Fu J, Du J, Xu W. The Role of D-3-Phosphoglycerate Dehydrogenase in Cancer. *Int J Biol Sci.* 2020;16(9):1495–1506.
235. Fan J, Teng X, Liu L, Mattaini KR, Looper RE, Vander Heiden MG, et al. Human Phosphoglycerate Dehydrogenase Produces the Oncometabolite D -2-Hydroxyglutarate. *ACS Chem Biol.* February 20, 2015;10(2):510–516.
236. Rzem R, Veiga-da-Cunha M, Noël G, Goffette S, Nassogne M-C, Tabarki B, et al. A gene encoding a putative FAD-dependent L -2-hydroxyglutarate dehydrogenase is mutated in L -2-hydroxyglutaric aciduria. *Proc Natl Acad Sci.* November 30, 2004;101(48):16849–16854.
237. Achouri Y, Noël G, Vertommen D, Rider MH, Veiga-Da-Cunha M, van SCHAFTINGEN E. Identification of a dehydrogenase acting on D -2-hydroxyglutarate. *Biochem J.* July 1,

- 2004;381(1):35–42.
238. Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, Kim S-H, et al. Oncometabolite 2-Hydroxyglutarate Is a Competitive Inhibitor of  $\alpha$ -Ketoglutarate-Dependent Dioxygenases. *Cancer Cell*. January 2011;19(1):17–30.
239. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. January 1, 2002;16(1):6–21.
240. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al. Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science*. May 15, 2009;324(5929):930–935.
241. Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*. August 2010;466(7310):1129–1133.
242. Tsagaratou A, Äijö T, Lio C-WJ, Yue X, Huang Y, Jacobsen SE, et al. Dissecting the dynamic changes of 5-hydroxymethylcytosine in T-cell development and differentiation. *Proc Natl Acad Sci*. August 12, 2014 [cited August 29, 2022];111(32). Available at: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1412327111>
243. Stroud H, Feng S, Morey Kinney S, Pradhan S, Jacobsen SE. 5-Hydroxymethylcytosine is associated with enhancers and gene bodies in human embryonic stem cells. *Genome Biol*. June 20, 2011;12(6):R54.
244. Moran-Crusio K, Reavie L, Shih A, Abdel-Wahab O, Ndiaye-Lobry D, Lobry C, et al. Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell*. July 12, 2011;20(1):11–24.
245. Guillaumot M, Cimmino L, Aifantis I. The Impact of DNA Methylation in Hematopoietic Malignancies. *Trends Cancer*. February 2016;2(2):70–83.
246. Bowman RL, Busque L, Levine RL. Clonal Hematopoiesis and Evolution to Hematopoietic Malignancies. *Cell Stem Cell*. February 2018;22(2):157–170.
247. Costa Y, Ding J, Theunissen TW, Faiola F, Hore TA, Shliaha PV, et al. NANOG-dependent function of TET1 and TET2 in establishment of pluripotency. *Nature*. March 21, 2013;495(7441):370–374.
248. Xiong J, Zhang Z, Chen J, Huang H, Xu Y, Ding X, et al. Cooperative Action between SALL4A and TET Proteins in Stepwise Oxidation of 5-Methylcytosine. *Mol Cell*. December 1, 2016;64(5):913–925.
249. Guilhamon P, Eskandarpour M, Halai D, Wilson GA, Feber A, Teschendorff AE, et al. Meta-analysis of IDH-mutant cancers identifies EBF1 as an interaction partner for TET2. *Nat Commun*. 2013;4:2166.
250. de la Rica L, Rodríguez-Ubreva J, García M, Islam ABMMK, Urquiza JM, Hernando H, et al. PU.1 target genes undergo Tet2-coupled demethylation and DNMT3b-mediated methylation in monocyte-to-osteoclast differentiation. *Genome Biol*. 2013;14(9):R99.
251. Kallin EM, Rodríguez-Ubreva J, Christensen J, Cimmino L, Aifantis I, Helin K, et al. Tet2 facilitates the derepression of myeloid target genes during CEBP $\alpha$ -induced transdifferentiation of pre-B cells. *Mol Cell*. October 26, 2012;48(2):266–276.
252. Lio C-W, Zhang J, González-Avalos E, Hogan PG, Chang X, Rao A. Tet2 and Tet3 cooperate with B-lineage transcription factors to regulate DNA modification and chromatin accessibility. *eLife*. November 21, 2016;5:e18290.
253. Lio C-WJ, Rao A. TET Enzymes and 5hmC in Adaptive and Innate Immune Systems. *Front Immunol*. February 12, 2019;10:210.
254. Ko M, An J, Pastor WA, Koralov SB, Rajewsky K, Rao A. TET proteins and 5-methylcytosine oxidation in hematological cancers. *Immunol Rev*. January 2015;263(1):6–21.
255. An J, González-Avalos E, Chawla A, Jeong M, López-Moyado IF, Li W, et al. Acute loss of TET function results in aggressive myeloid cancer in mice. *Nat Commun*. December

2015;6(1):10071.

256. Solary E, Bernard OA, Tefferi A, Fuks F, Vainchenker W. The Ten-Eleven Translocation-2 (TET2) gene in hematopoiesis and hematopoietic diseases. *Leukemia*. March 2014;28(3):485–496.
257. Ko M, Bandukwala HS, An J, Lamperti ED, Thompson EC, Hastie R, et al. Ten-Eleven-Translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice. *Proc Natl Acad Sci*. August 30, 2011;108(35):14566–14571.
258. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 Mutations Result in a Hypermethylation Phenotype, Disrupt TET2 Function, and Impair Hematopoietic Differentiation. *Cancer Cell*. December 2010;18(6):553–567.
259. Fu L, Guerrero CR, Zhong N, Amato NJ, Liu Y, Liu S, et al. Tet-Mediated Formation of 5-Hydroxymethylcytosine in RNA. *J Am Chem Soc*. August 20, 2014;136(33):11582–11585.
260. Lan J, Rajan N, Bizet M, Penning A, Singh NK, Guallar D, et al. Functional role of Tet-mediated RNA hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nat Commun*. December 2020;11(1):4956.
261. Zhao BS, Roundtree IA, He C. Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications. *Nat Rev Mol Cell Biol*. January 2017;18(1):31–42.
262. Jansson MD, Häfner SJ, Altinel K, Tehler D, Krogh N, Jakobsen E, et al. Regulation of translation by site-specific ribosomal RNA methylation. *Nat Struct Mol Biol*. November 2021;28(11):889–899.
263. Chowdhury R, Yeoh KK, Tian Y, Hillringhaus L, Bagg EA, Rose NR, et al. The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases. *EMBO Rep*. May 2011;12(5):463–469.
264. Schwartzman J-M, Reuter VP, Koche RP, Thompson CB. 2-hydroxyglutarate inhibits MyoD-mediated differentiation by preventing H3K9 demethylation. *Proc Natl Acad Sci*. June 25, 2019;116(26):12851–12856.
265. Lu C, Ward PS, Kapoor GS, Rohle D, Turcan S, Abdel-Wahab O, et al. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature*. March 2012;483(7390):474–478.
266. Kernytsky A, Wang F, Hansen E, Schalm S, Straley K, Gliser C, et al. IDH2 mutation-induced histone and DNA hypermethylation is progressively reversed by small-molecule inhibition. *Blood*. January 8, 2015;125(2):296–303.
267. Sulkowski PL, Corso CD, Robinson ND, Scanlon SE, Purshouse KR, Bai H, et al. 2-Hydroxyglutarate produced by neomorphic IDH mutations suppresses homologous recombination and induces PARP inhibitor sensitivity. *Sci Transl Med*. February 2017;9(375):eaal2463.
268. Inoue S, Li WY, Tseng A, Beerman I, Elia AJ, Bendall SC, et al. Mutant IDH1 Downregulates ATM and Alters DNA Repair and Sensitivity to DNA Damage Independent of TET2. *Cancer Cell*. August 8, 2016;30(2):337–348.
269. Sulkowski PL, Oeck S, Dow J, Economos NG, Mirfakhraie L, Liu Y, et al. Oncometabolites suppress DNA repair by disrupting local chromatin signalling. *Nature*. June 2020;582(7813):586–591.
270. Stracker TH, Roig I, Knobel PA, Marjanović M. The ATM signaling network in development and disease. *Front Genet*. 2013;4:37.
271. Takagi M, Sato M, Piao J, Miyamoto S, Isoda T, Kitagawa M, et al. ATM-dependent DNA damage-response pathway as a determinant in chronic myelogenous leukemia. *DNA Repair*. July 2013;12(7):500–507.
272. Núñez FJ, Mendez FM, Kadiyala P, Alghamri MS, Savelieff MG, Garcia-Fabiani MB, et al. IDH1-R132H acts as a tumor suppressor in glioma via epigenetic up-regulation of the

- DNA damage response. *Sci Transl Med*. February 13, 2019;11(479):eaaq1427.
273. Molenaar RJ, Maciejewski JP, Wilmink JW, van Noorden CJF. Wild-type and mutated IDH1/2 enzymes and therapy responses. *Oncogene*. April 2018;37(15):1949–1960.
274. Maifrede S, Le BV, Nieborowska-Skorska M, Golovine K, Sullivan-Reed K, Dunuwille WMB, et al. TET2 and DNMT3A Mutations Exert Divergent Effects on DNA Repair and Sensitivity of Leukemia Cells to PARP Inhibitors. *Cancer Res*. October 1, 2021;81(19):5089–5101.
275. Sule A, Van Doorn J, Sundaram RK, Ganesa S, Vasquez JC, Bindra RS. Targeting IDH1/2 mutant cancers with combinations of ATR and PARP inhibitors. *NAR Cancer*. June 2021;3(2):zcab018.
276. Trewick SC, Henshaw TF, Hausinger RP, Lindahl T, Sedgwick B. Oxidative demethylation by *Escherichia coli* AlkB directly reverts DNA base damage. *Nature*. September 12, 2002;419(6903):174–178.
277. Chen F, Bian K, Tang Q, Fedeles BI, Singh V, Humulock ZT, et al. Oncometabolites d- and l-2-Hydroxyglutarate Inhibit the AlkB Family DNA Repair Enzymes under Physiological Conditions. *Chem Res Toxicol*. April 17, 2017;30(4):1102–1110.
278. Wang P, Wu J, Ma S, Zhang L, Yao J, Hoadley KA, et al. Oncometabolite D-2-Hydroxyglutarate Inhibits ALKBH DNA Repair Enzymes and Sensitizes IDH Mutant Cells to Alkylating Agents. *Cell Rep*. December 22, 2015;13(11):2353–2361.
279. Shi DD, Savani MR, Levitt MM, Wang AC, Endress JE, Bird CE, et al. De novo pyrimidine synthesis is a targetable vulnerability in IDH mutant glioma. *Cancer Cell*. September 12, 2022;40(9):939-956.e16.
280. Beuneu C, Auger R, Löffler M, Guissani A, Lemaire G, Lepoivre M. Indirect inhibition of mitochondrial dihydroorotate dehydrogenase activity by nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. April 15, 2000;28(8):1206–1213.
281. Sykes DB, Kfoury YS, Mercier FE, Wawer MJ, Law JM, Haynes MK, et al. Inhibition of Dihydroorotate Dehydrogenase Overcomes Differentiation Blockade in Acute Myeloid Leukemia. *Cell*. September 2016;167(1):171-186.e15.
282. Christian S, Merz C, Evans L, Gradl S, Seidel H, Friberg A, et al. The novel dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) inhibitor BAY 2402234 triggers differentiation and is effective in the treatment of myeloid malignancies. *Leukemia*. October 2019;33(10):2403–2415.
283. Semenza GL. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:47–71.
284. Balamurugan K. HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer. *Int J Cancer*. March 1, 2016;138(5):1058–1066.
285. Kaelin WG, Ratcliffe PJ. Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway. *Mol Cell*. May 2008;30(4):393–402.
286. Koivunen P, Lee S, Duncan CG, Lopez G, Lu G, Ramkissoon S, et al. Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation. *Nature*. February 15, 2012;483(7390):484–488.
287. Kickingreder P, Sahm F, Radbruch A, Wick W, Heiland S, Deimling A von, et al. IDH mutation status is associated with a distinct hypoxia/angiogenesis transcriptome signature which is non-invasively predictable with rCBV imaging in human glioma. *Sci Rep*. November 5, 2015;5:16238.
288. Tarhonskaya H, Rydzik AM, Leung IKH, Loik ND, Chan MC, Kawamura A, et al. Non-enzymatic chemistry enables 2-hydroxyglutarate-mediated activation of 2-oxoglutarate oxygenases. *Nat Commun*. March 5, 2014;5:3423.
289. Walling C, Amarnath K. Oxidation of mandelic acid by Fenton's reagent. *J Am Chem Soc*. March 1982;104(5):1185–1189.
290. Losman J-A, Looper RE, Koivunen P, Lee S, Schneider RK, McMahon C, et al. (R)-2-



- Hydroxyglutarate Is Sufficient to Promote Leukemogenesis and Its Effects Are Reversible. *Science*. March 29, 2013;339(6127):1621–1625.
291. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, et al. Reactive Oxygen Species Generated at Mitochondrial Complex III Stabilize Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  during Hypoxia. *J Biol Chem*. August 2000;275(33):25130–25138.
292. Tennant DA, Frezza C, MacKenzie ED, Nguyen QD, Zheng L, Selak MA, et al. Reactivating HIF prolyl hydroxylases under hypoxia results in metabolic catastrophe and cell death. *Oncogene*. November 12, 2009;28(45):4009–4021.
293. Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet TIG*. January 2004;20(1):33–43.
294. Sasaki M, Knobbe CB, Itsumi M, Elia AJ, Harris IS, Chio IIC, et al. D-2-hydroxyglutarate produced by mutant IDH1 perturbs collagen maturation and basement membrane function. *Genes Dev*. September 15, 2012;26(18):2038–2049.
295. Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. June 2003;3(6):422–433.
296. Holster T, Pakkanen O, Soininen R, Sormunen R, Nokelainen M, Kivirikko KI, et al. Loss of assembly of the main basement membrane collagen, type IV, but not fibril-forming collagens and embryonic death in collagen prolyl 4-hydroxylase I null mice. *J Biol Chem*. January 26, 2007;282(4):2512–2519.
297. Rautavuoma K, Takaluoma K, Sormunen R, Myllyharju J, Kivirikko KI, Soininen R. Premature aggregation of type IV collagen and early lethality in lysyl hydroxylase 3 null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. September 28, 2004;101(39):14120–14125.
298. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. July 2007;8(7):519–529.
299. Lasho TL, Jimma T, Finke CM, Patnaik M, Hanson CA, Ketterling RP, et al. SRSF2 mutations in primary myelofibrosis: significant clustering with IDH mutations and independent association with inferior overall and leukemia-free survival. *Blood*. November 15, 2012;120(20):4168–4171.
300. Shukla S, Kavak E, Gregory M, Imashimizu M, Shutinoski B, Kashlev M, et al. CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature*. November 2011;479(7371):74–79.
301. Dvinge H, Bradley RK. Widespread intron retention diversifies most cancer transcriptomes. *Genome Med*. December 2015;7(1):45.
302. Chen C, Liu Y, Lu C, Cross JR, Morris JP, Shroff AS, et al. Cancer-associated IDH2 mutants drive an acute myeloid leukemia that is susceptible to Brd4 inhibition. *Genes Dev*. September 15, 2013;27(18):1974–1985.
303. Tateishi K, Wakimoto H, Iafrate AJ, Tanaka S, Loebel F, Lelic N, et al. Extreme Vulnerability of IDH1 Mutant Cancers to NAD<sup>+</sup> Depletion. *Cancer Cell*. December 14, 2015;28(6):773–784.
304. Fu X, Chin RM, Vergnes L, Hwang H, Deng G, Xing Y, et al. 2-Hydroxyglutarate Inhibits ATP Synthase and mTOR Signaling. *Cell Metab*. September 1, 2015;22(3):508–515.
305. Li F, He X, Ye D, Lin Y, Yu H, Yao C, et al. NADP(+)-IDH Mutations Promote Hypersuccinylation that Impairs Mitochondria Respiration and Induces Apoptosis Resistance. *Mol Cell*. November 19, 2015;60(4):661–675.
306. Chan SM, Thomas D, Corces-Zimmerman MR, Xavy S, Rastogi S, Hong W-J, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations induce BCL-2 dependence in acute myeloid leukemia. *Nat Med*. February 2015;21(2):178–184.
307. Konopleva M, Pollyea DA, Potluri J, Chyla B, Hogdal L, Busman T, et al. Efficacy and Biological Correlates of Response in a Phase II Study of Venetoclax Monotherapy in Patients with Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Discov*. October 2016;6(10):1106–

1117.

308. Cathelin S, Sharon D, Subedi A, Cojocari D, Phillips DC, Levenson JD, et al. Combination of Enasidenib and Venetoclax Shows Superior Anti-Leukemic Activity Against IDH2 Mutated AML in Patient-Derived Xenograft Models. *Blood*. November 29, 2018;132(Supplement 1):562–562.
309. Stuani L, Riols F, Millard P, Sabatier M, Batut A, Saland E, et al. Stable Isotope Labeling Highlights Enhanced Fatty Acid and Lipid Metabolism in Human Acute Myeloid Leukemia. *Int J Mol Sci*. October 25, 2018;19(11):E3325.
310. Stuani L, Sabatier M, Saland E, Cognet G, Poupin N, Bosc C, et al. Mitochondrial metabolism supports resistance to IDH mutant inhibitors in acute myeloid leukemia. *J Exp Med*. May 3, 2021;218(5):e20200924.
311. Xu Q, Li Y, Lv N, Jing Y, Xu Y, Li Y, et al. Correlation Between Isocitrate Dehydrogenase Gene Aberrations and Prognosis of Patients with Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. August 1, 2017;23(15):4511–4522.
312. DiNardo CD, Ravandi F, Agresta S, Konopleva M, Takahashi K, Kadia T, et al. Characteristics, clinical outcome, and prognostic significance of IDH mutations in AML. *Am J Hematol*. August 2015;90(8):732–736.
313. Guryanova OA, Shank K, Spitzer B, Luciani L, Koche RP, Garrett-Bakelman FE, et al. DNMT3A mutations promote anthracycline resistance in acute myeloid leukemia via impaired nucleosome remodeling. *Nat Med*. December 2016;22(12):1488–1495.
314. Bradstock KF, Link E, Di Iulio J, Szer J, Marlton P, Wei AH, et al. Idarubicin Dose Escalation During Consolidation Therapy for Adult Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. May 20, 2017;35(15):1678–1685.
315. Sehgal AR, Gimotty PA, Zhao J, Hsu J-M, Daber R, Morrissette JD, et al. DNMT3A Mutational Status Affects the Results of Dose-Escalated Induction Therapy in Acute Myelogenous Leukemia. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. April 1, 2015;21(7):1614–1620.
316. Luskin MR, Lee J-W, Fernandez HF, Abdel-Wahab O, Bennett JM, Ketterling RP, et al. Benefit of high-dose daunorubicin in AML induction extends across cytogenetic and molecular groups. *Blood*. March 24, 2016;127(12):1551–1558.
317. Kantarjian HM, Thomas XG, Dmoszynska A, Wierzbowska A, Mazur G, Mayer J, et al. Multicenter, randomized, open-label, phase III trial of decitabine versus patient choice, with physician advice, of either supportive care or low-dose cytarabine for the treatment of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. July 20, 2012;30(21):2670–2677.
318. DiNardo CD, Patel KP, Garcia-Manero G, Luthra R, Pierce S, Borthakur G, et al. Lack of association of *IDH1*, *IDH2* and *DNMT3A* mutations with outcome in older patients with acute myeloid leukemia treated with hypomethylating agents. *Leuk Lymphoma*. August 2014;55(8):1925–1929.
319. Kroeze LI, Aslanyan MG, van Rooij A, Koorenhof-Scheele TN, Massop M, Carell T, et al. Characterization of acute myeloid leukemia based on levels of global hydroxymethylation. *Blood*. August 14, 2014;124(7):1110–1118.
320. Wang F, Travins J, DeLaBarre B, Penard-Lacronique V, Schalm S, Hansen E, et al. Targeted inhibition of mutant IDH2 in leukemia cells induces cellular differentiation. *Science*. May 3, 2013;340(6132):622–626.
321. Birendra KC, DiNardo CD. Evidence for Clinical Differentiation and Differentiation Syndrome in Patients With Acute Myeloid Leukemia and IDH1 Mutations Treated With the Targeted Mutant IDH1 Inhibitor, AG-120. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. August 2016;16(8):460–465.
322. Stein EM, DiNardo CD, Pollyea DA, Fathi AT, Roboz GJ, Altman JK, et al. Enasidenib

- in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. August 10, 2017;130(6):722–731.
323. Amatangelo MD, Quek L, Shih A, Stein EM, Roshal M, David MD, et al. Enasidenib induces acute myeloid leukemia cell differentiation to promote clinical response. *Blood*. August 10, 2017;130(6):732–741.
324. DiNardo CD, Schuh AC, Stein EM, Montesinos P, Wei AH, de Botton S, et al. Enasidenib plus azacitidine versus azacitidine alone in patients with newly diagnosed, mutant-IDH2 acute myeloid leukaemia (AG221-AML-005): a single-arm, phase 1b and randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. November 2021;22(11):1597–1608.
325. DiNardo CD, de Botton S, Stein EM, Roboz GJ, Swords RT, Pollyea DA, et al. Determination of IDH1 Mutational Burden and Clearance Via Next-Generation Sequencing in Patients with IDH1 Mutation-Positive Hematologic Malignancies Receiving AG-120, a First-in-Class Inhibitor of Mutant IDH1. *Blood*. December 2, 2016;128(22):1070–1070.
326. Choe S, Wang H, DiNardo CD, Stein EM, de Botton S, Roboz GJ, et al. Molecular mechanisms mediating relapse following ivosidenib monotherapy in IDH1-mutant relapsed or refractory AML. *Blood Adv*. May 12, 2020;4(9):1894–1905.
327. DiNardo CD, Stein EM, de Botton S, Roboz GJ, Altman JK, Mims AS, et al. Durable Remissions with Ivosidenib in *IDH1* -Mutated Relapsed or Refractory AML. *N Engl J Med*. June 21, 2018;378(25):2386–2398.
328. Wang F, Morita K, DiNardo CD, Furudate K, Tanaka T, Yan Y, et al. Leukemia stemness and co-occurring mutations drive resistance to IDH inhibitors in acute myeloid leukemia. *Nat Commun*. December 2021;12(1):2607.
329. DiNardo CD, Stein AS, Fathi AT, Montesinos P, Odenike O, Kantarjian HM, et al. Mutant Isocitrate Dehydrogenase (mIDH) Inhibitors, Enasidenib or Ivosidenib, in Combination with Azacitidine (AZA): Preliminary Results of a Phase 1b/2 Study in Patients with Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood*. December 7, 2017;130(Suppl\_1):639–639.
330. Gruber E, So J, Lewis AC, Franich R, Cole R, Martelotto LG, et al. Inhibition of mutant IDH1 promotes cycling of acute myeloid leukemia stem cells [Internet]. *Cancer Biology* 2022 Apr [cited October 22, 2022]. Available at: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2022.04.06.487420>
331. DiNardo CD, Hochhaus A, Frattini MG, Yee K, Zander T, Krämer A, et al. A phase 1 study of IDH305 in patients with IDH1R132-mutant acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome. *J Cancer Res Clin Oncol*. March 30, 2022;
332. De Botton S, Yee K, Recher C, Wei AH, Montesinos P, Taussig D, et al. Molecular Characteristics of Response to Olutasidenib (FT-2102) in Patients with Relapsed/Refractory mIDH1 Acute Myeloid Leukemia. *Blood*. November 5, 2021;138(Supplement 1):2351–2351.
333. Cortes JE, Esteve J, Bajel A, Yee K, Braun T, De Botton S, et al. Olutasidenib (FT-2102) in Combination with Azacitidine Induces Durable Complete Remissions in Patients with mIDH1 Acute Myeloid Leukemia. *Blood*. November 5, 2021;138(Supplement 1):698–698.
334. Konteatis Z, Artin E, Nicolay B, Straley K, Padyana AK, Jin L, et al. Vorasidenib (AG-881): A First-in-Class, Brain-Penetrant Dual Inhibitor of Mutant IDH1 and 2 for Treatment of Glioma. *ACS Med Chem Lett*. February 13, 2020;11(2):101–107.
335. Quek L, David MD, Kennedy A, Metzner M, Amatangelo M, Shih A, et al. Clonal heterogeneity of acute myeloid leukemia treated with the IDH2 inhibitor enasidenib. *Nat Med*. August 1, 2018;24(8):1167–1177.
336. Harding JJ, Lowery MA, Shih AH, Schvartzman JM, Hou S, Famulare C, et al. Isoform Switching as a Mechanism of Acquired Resistance to Mutant Isocitrate Dehydrogenase Inhibition. *Cancer Discov*. 2018;8(12):1540.

337. Oltvai ZN, Harley SE, Koes D, Michel S, Warlick ED, Nelson AC, et al. Assessing acquired resistance to IDH1 inhibitor therapy by full-exon *IDH1* sequencing and structural modeling. *Mol Case Stud*. April 2021;7(2):a006007.
338. Gatto L, Franceschi E, Tosoni A, Di Nunno V, Maggio I, Lodi R, et al. IDH Inhibitors and Beyond: The Cornerstone of Targeted Glioma Treatment. *Mol Diagn Ther*. July 2021;25(4):457–473.
339. Brown AL, Hahn CN, Scott HS. Secondary leukemia in patients with germline transcription factor mutations (RUNX1, GATA2, CEBPA). *Blood*. July 2, 2020;136(1):24–35.
340. Yao K, Liu H, Yu S, Zhu H, Pan J. Resistance to mutant IDH inhibitors in acute myeloid leukemia: Molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Cancer Lett*. May 2022;533:215603.
341. Lynch CJ, Adams SH. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol*. December 2014;10(12):723–736.
342. Chen M, Gao C, Yu J, Ren S, Wang M, Wynn RM, et al. Therapeutic Effect of Targeting Branched-Chain Amino Acid Catabolic Flux in Pressure-Overload Induced Heart Failure. *J Am Heart Assoc*. June 4, 2019;8(11):e011625.
343. Kamphorst JJ, Nofal M, Commisso C, Hackett SR, Lu W, Grabocka E, et al. Human pancreatic cancer tumors are nutrient poor and tumor cells actively scavenge extracellular protein. *Cancer Res*. February 1, 2015;75(3):544–553.
344. Sivanand S, Vander Heiden MG. Emerging Roles for Branched-Chain Amino Acid Metabolism in Cancer. *Cancer Cell*. February 10, 2020;37(2):147–156.
345. Baracos VE, Mackenzie ML. Investigations of branched-chain amino acids and their metabolites in animal models of cancer. *J Nutr*. January 2006;136(1 Suppl):237S–42S.
346. Yoneshiro T, Wang Q, Tajima K, Matsushita M, Maki H, Igarashi K, et al. BCAA catabolism in brown fat controls energy homeostasis through SLC25A44. *Nature*. August 2019;572(7771):614–619.
347. Peng H, Wang Y, Luo W. Multifaceted role of branched-chain amino acid metabolism in cancer. *Oncogene*. October 29, 2020;39(44):6747–6756.
348. Hall TR, Wallin R, Reinhart GD, Hutson SM. Branched chain aminotransferase isoenzymes. Purification and characterization of the rat brain isoenzyme. *J Biol Chem*. February 15, 1993;268(5):3092–3098.
349. Gray S, Wang B, Orihuela Y, Hong E-G, Fisch S, Haldar S, et al. Regulation of Gluconeogenesis by Krüppel-like Factor 15. *Cell Metab*. April 2007;5(4):305–312.
350. East MP, Laitinen T, Asquith CRM. BCKDK: an emerging kinase target for metabolic diseases and cancer. *Nat Rev Drug Discov*. July 2021;20(7):498.
351. Oyarzabal A, Martínez-Pardo M, Merinero B, Navarrete R, Desviat LR, Ugarte M, et al. A Novel Regulatory Defect in the Branched-Chain  $\alpha$ -Keto Acid Dehydrogenase Complex Due to a Mutation in the *PPM1K* Gene Causes a Mild Variant Phenotype of Maple Syrup Urine Disease. *Hum Mutat*. February 2013;34(2):355–362.
352. Harris RA, Joshi M, Jeoung NH, Obayashi M. Overview of the Molecular and Biochemical Basis of Branched-Chain Amino Acid Catabolism. *J Nutr*. June 1, 2005;135(6):1527S-1530S.
353. Ananieva EA, Wilkinson AC. Branched-chain amino acid metabolism in cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. January 2018;21(1):64–70.
354. Chen S, Chen B, Su G, Chen J, Guo D, Yin Q, et al. Branched-chain amino acid aminotransferase-1 regulates self-renewal and pluripotency of mouse embryonic stem cells through Ras signaling. *Stem Cell Res*. December 2020;49:102097.
355. Cano-Crespo S, Chillarón J, Junza A, Fernández-Miranda G, García J, Polte C, et al. CD98hc (SLC3A2) sustains amino acid and nucleotide availability for cell cycle progression. *Sci Rep*. December 2019;9(1):14065.
356. Wang T, Yu H, Hughes NW, Liu B, Kendirli A, Klein K, et al. Gene Essentiality

- Profiling Reveals Gene Networks and Synthetic Lethal Interactions with Oncogenic Ras. *Cell*. February 23, 2017;168(5):890-903.e15.
357. Ma Y, Song J, Chen B, Xu X, Lin G. SLC7A5 act as a potential leukemic transformation target gene in myelodysplastic syndrome. *Oncotarget*. February 9, 2016;7(6):6566–6575.
358. Bajaj J, Konuma T, Lytle NK, Kwon HY, Ablack JN, Cantor JM, et al. CD98-Mediated Adhesive Signaling Enables the Establishment and Propagation of Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Cell*. November 2016;30(5):792–805.
359. Wang X, Chen J, Liu X, Zeng X, Long Q, Liu Y, et al. Evaluation of CD98 light chain-LAT1 as a potential marker of cancer stem-like cells in glioblastoma. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. September 2022;1869(9):119303.
360. Friedrich M, Sankowski R, Bunse L, Kilian M, Green E, Ramallo Guevara C, et al. Tryptophan metabolism drives dynamic immunosuppressive myeloid states in IDH-mutant gliomas. *Nat Cancer*. July 2021;2(7):723–740.
361. Cappoli N, Jenkinson MD, Dello Russo C, Dickens D. LAT1, a novel pharmacological target for the treatment of glioblastoma. *Biochem Pharmacol*. July 2022;201:115103.
362. Xu S, Tang K, Meng L, Tang Y. Suppression of amino acid transporter LAT3 expression on proliferation of K562 cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. October 2013;33(5):632–635.
363. Oda K, Hosoda N, Endo H, Saito K, Tsujihara K, Yamamura M, et al. I-Type amino acid transporter 1 inhibitors inhibit tumor cell growth. *Cancer Sci*. January 2010;101(1):173–179.
364. Cormerais Y, Giuliano S, LeFloch R, Front B, Durivault J, Tambutté E, et al. Genetic Disruption of the Multifunctional CD98/LAT1 Complex Demonstrates the Key Role of Essential Amino Acid Transport in the Control of mTORC1 and Tumor Growth. *Cancer Res*. August 1, 2016;76(15):4481–4492.
365. Nishikubo K, Ohgaki R, Okanishi H, Okuda S, Xu M, Endou H, et al. Pharmacologic inhibition of LAT1 predominantly suppresses transport of large neutral amino acids and downregulates global translation in cancer cells. *J Cell Mol Med*. September 7, 2022;
366. Li J-T, Yin M, Wang D, Wang J, Lei M-Z, Zhang Y, et al. BCAT2-mediated BCAA catabolism is critical for development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Cell Biol*. February 2020;22(2):167–174.
367. Zhang L, Han J. Branched-chain amino acid transaminase 1 (BCAT1) promotes the growth of breast cancer cells through improving mTOR-mediated mitochondrial biogenesis and function. *Biochem Biophys Res Commun*. April 2017;486(2):224–231.
368. Zheng Y-H, Hu W-J, Chen B-C, Grahn T-H-M, Zhao Y-R, Bao H-L, et al. BCAT1, a key prognostic predictor of hepatocellular carcinoma, promotes cell proliferation and induces chemoresistance to cisplatin. *Liver Int*. December 2016;36(12):1836–1847.
369. Ericksen RE, Lim SL, McDonnell E, Shuen WH, Vadiveloo M, White PJ, et al. Loss of BCAA Catabolism during Carcinogenesis Enhances mTORC1 Activity and Promotes Tumor Development and Progression. *Cell Metab*. May 7, 2019;29(5):1151-1165.e6.
370. Panosyan EH, Lin HJ, Koster J, Lasky JL. In search of druggable targets for GBM amino acid metabolism. *BMC Cancer*. December 2017;17(1):162.
371. Wang Z-Q, Faddaoui A, Bachvarova M, Plante M, Gregoire J, Renaud M-C, et al. BCAT1 expression associates with ovarian cancer progression: possible implications in altered disease metabolism. *Oncotarget*. October 13, 2015;6(31):31522–31543.
372. Taya Y, Ota Y, Wilkinson AC, Kanazawa A, Watarai H, Kasai M, et al. Depleting dietary valine permits nonmyeloablative mouse hematopoietic stem cell transplantation. *Science*. December 2, 2016;354(6316):1152–1155.
373. Liu X, Zhang F, Zhang Y, Li X, Chen C, Zhou M, et al. PPM1K Regulates Hematopoiesis and Leukemogenesis through CDC20-Mediated Ubiquitination of MEIS1 and

- p21. *Cell Rep.* May 1, 2018;23(5):1461–1475.
374. Papathanassiou AE, Ko J-H, Imprialou M, Bagnati M, Srivastava PK, Vu HA, et al. BCAT1 controls metabolic reprogramming in activated human macrophages and is associated with inflammatory diseases. *Nat Commun.* December 2017;8(1):16040.
375. Ko J-H, Olona A, Papathanassiou AE, Buang N, Park K-S, Costa ASH, et al. BCAT1 affects mitochondrial metabolism independently of leucine transamination in activated human macrophages. *J Cell Sci.* January 1, 2020;jcs.247957.
376. Gu Z, Liu Y, Cai F, Patrick M, Zmajkovic J, Cao H, et al. Loss of EZH2 Reprograms BCAA Metabolism to Drive Leukemic Transformation. *Cancer Discov.* September 2019;9(9):1228–1247.
377. Kikushige Y, Miyamoto T, Kochi Y, Semba Y, Ohishi M, Irifune H, et al. Human acute leukemia utilizes branched-chain amino acid catabolism to maintain stemness through regulating PRC2 function. *Blood Adv.* August 31, 2022;bloodadvances.2022008242.
378. Hattori A, Tsunoda M, Konuma T, Kobayashi M, Nagy T, Glushka J, et al. Cancer progression by reprogrammed BCAA metabolism in myeloid leukaemia. *Nature.* May 25, 2017;545(7655):500–504.
379. Raffel S, Falcone M, Kneisel N, Hansson J, Wang W, Lutz C, et al. BCAT1 restricts  $\alpha$ KG levels in AML stem cells leading to IDHmut-like DNA hypermethylation. *Nature.* November 16, 2017;551(7680):384–388.
380. Xie F, He M, He L, Liu K, Li M, Hu G, et al. Bipartite network analysis reveals metabolic gene expression profiles that are highly associated with the clinical outcomes of acute myeloid leukemia. *Comput Biol Chem.* April 2017;67:150–157.
381. Jin J, Jin J, Pan J, Wang Y, Huang S, Mao S, et al. High Expression of BCAT1 promotes Acute Myeloid Leukemia Progression and Sensitize to PARP Inhibitor. *Blood.* November 13, 2019;134(Supplement\_1):5041–5041.
382. Hillier J, Allcott GJ, Guest LA, Heaselgrave W, Tonks A, Conway ME, et al. The BCAT1 CXXC Motif Provides Protection against ROS in Acute Myeloid Leukaemia Cells. *Antioxid Basel Switz.* March 31, 2022;11(4):683.
383. Xu M, Liu Q, Jia Y, Tu K, Yao Y, Liu Q, et al. BCAT1 promotes tumor cell migration and invasion in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett.* October 2016;12(4):2648–2656.
384. Zhou W, Feng X, Ren C, Jiang X, Liu W, Huang W, et al. Over-expression of BCAT1, a c-Myc target gene, induces cell proliferation, migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma. *Mol Cancer.* December 2013;12(1):53.
385. Zhang B, Chen Y, Shi X, Zhou M, Bao L, Hatanpaa KJ, et al. Regulation of branched-chain amino acid metabolism by hypoxia-inducible factor in glioblastoma. *Cell Mol Life Sci.* January 2021;78(1):195–206.
386. Zhu Z, Achreja A, Meurs N, Animasahun O, Owen S, Mittal A, et al. Tumour-reprogrammed stromal BCAT1 fuels branched-chain ketoacid dependency in stromal-rich PDAC tumours. *Nat Metab.* August 2020;2(8):775–792.
387. Silva LS, Poschet G, Nonnenmacher Y, Becker HM, Sapcariu S, Gaupel A, et al. Branched-chain ketoacids secreted by glioblastoma cells via MCT 1 modulate macrophage phenotype. *EMBO Rep.* December 2017;18(12):2172–2185.
388. Tönjes M, Barbus S, Park YJ, Wang W, Schlotter M, Lindroth AM, et al. BCAT1 promotes cell proliferation through amino acid catabolism in gliomas carrying wild-type IDH1. *Nat Med.* July 2013;19(7):901–908.
389. Yi L, Fan X, Li J, Yuan F, Zhao J, Nistér M, et al. Enrichment of branched chain amino acid transaminase 1 correlates with multiple biological processes and contributes to poor survival of IDH1 wild-type gliomas. *Aging.* January 20, 2021;13(3):3645–3660.
390. McBrayer SK, Mayers JR, DiNatale GJ, Shi DD, Khanal J, Chakraborty AA, et al. Transaminase Inhibition by 2-Hydroxyglutarate Impairs Glutamate Biosynthesis and Redox

- Homeostasis in Glioma. *Cell*. September 20, 2018;175(1):101-116.e25.
391. Francois L, Boskovic P, Knerr J, He W, Sigismondo G, Schwan C, et al. BCAT1 redox function maintains mitotic fidelity. *Cell Rep*. October 2022;41(3):111524.
392. Garber AJ, Karl IE, Kipnis DM. Alanine and glutamine synthesis and release from skeletal muscle. II. The precursor role of amino acids in alanine and glutamine synthesis. *J Biol Chem*. February 10, 1976;251(3):836–843.
393. Avruch J, Long X, Ortiz-Vega S, Rapley J, Papageorgiou A, Dai N. Amino acid regulation of TOR complex 1. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*. April 2009;296(4):E592–E602.
394. Wolfson RL, Chantranupong L, Saxton RA, Shen K, Scaria SM, Cantor JR, et al. Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway. *Science*. January 1, 2016;351(6268):43–48.
395. Saxton RA, Knockenhauer KE, Wolfson RL, Chantranupong L, Pacold ME, Wang T, et al. Structural basis for leucine sensing by the Sestrin2-mTORC1 pathway. *Science*. January 1, 2016;351(6268):53–58.
396. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci*. October 15, 2009;122(Pt 20):3589–3594.
397. Xu Q, Simpson S-E, Scialla TJ, Bagg A, Carroll M. Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood*. August 1, 2003;102(3):972–980.
398. Kornblau SM, Womble M, Qiu YH, Jackson CE, Chen W, Konopleva M, et al. Simultaneous activation of multiple signal transduction pathways confers poor prognosis in acute myelogenous leukemia. *Blood*. October 1, 2006;108(7):2358–2365.
399. Tamburini J, Chapuis N, Bardet V, Park S, Sujobert P, Willems L, et al. Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition activates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt by up-regulating insulin-like growth factor-1 receptor signaling in acute myeloid leukemia: rationale for therapeutic inhibition of both pathways. *Blood*. January 1, 2008;111(1):379–382.
400. Kojima K, Shimanuki M, Shikami M, Samudio IJ, Ruvolo V, Corn P, et al. The dual PI3 kinase/mTOR inhibitor PI-103 prevents p53 induction by Mdm2 inhibition but enhances p53-mediated mitochondrial apoptosis in p53 wild-type AML. *Leukemia*. September 2008;22(9):1728–1736.
401. Rahmani M, Aust MM, Attkisson E, Williams DC, Ferreira-Gonzalez A, Grant S. Dual inhibition of Bcl-2 and Bcl-xL strikingly enhances PI3K inhibition-induced apoptosis in human myeloid leukemia cells through a GSK3- and Bim-dependent mechanism. *Cancer Res*. February 15, 2013;73(4):1340–1351.
402. Mirabilii S, Ricciardi M, Piedimonte M, Gianfelici V, Bianchi M, Tafuri A. Biological Aspects of mTOR in Leukemia. *Int J Mol Sci*. August 14, 2018;19(8):2396.
403. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. March 9, 2017;168(6):960–976.
404. Ananieva EA, Patel CH, Drake CH, Powell JD, Hutson SM. Cytosolic Branched Chain Aminotransferase (BCATc) Regulates mTORC1 Signaling and Glycolytic Metabolism in CD4+ T Cells. *J Biol Chem*. July 2014;289(27):18793–18804.
405. Thewes V, Simon R, Hlevnjak M, Schlotter M, Schroeter P, Schmidt K, et al. The branched-chain amino acid transaminase 1 sustains growth of antiestrogen-resistant and ER $\alpha$ -negative breast cancer. *Oncogene*. July 20, 2017;36(29):4124–4134.
406. Wang Y, Zhang J, Ren S, Sun D, Huang H-Y, Wang H, et al. Branched-Chain Amino Acid Metabolic Reprogramming Orchestrates Drug Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. *Cell Rep*. July 2019;28(2):512-525.e6.
407. Ni F, Yu W-M, Li Z, Graham DK, Jin L, Kang S, et al. Critical role of ASCT2-mediated amino acid metabolism in promoting leukaemia development and progression. *Nat Metab*. March 2019;1(3):390–403.

408. Hitzerd SM, Verbrugge SE, Ossenkuppele G, Jansen G, Peters GJ. Positioning of aminopeptidase inhibitors in next generation cancer therapy. *Amino Acids*. April 2014;46(4):793–808.
409. Mawad R, Becker PS, Hendrie P, Scott B, Wood BL, Dean C, et al. Phase II study of tosedostat with cytarabine or decitabine in newly diagnosed older patients with acute myeloid leukaemia or high-risk MDS. *Br J Haematol*. January 2016;172(2):238–245.
410. Laugesen A, Højfeldt JW, Helin K. Molecular Mechanisms Directing PRC2 Recruitment and H3K27 Methylation. *Mol Cell*. April 2019;74(1):8–18.
411. Court F, Le Boiteux E, Fogli A, Müller-Barthélémy M, Vaurs-Barrière C, Chautard E, et al. Transcriptional alterations in glioma result primarily from DNA methylation-independent mechanisms. *Genome Res*. October 2019;29(10):1605–1621.
412. Oktyabri D, Ishimura A, Tange S, Terashima M, Suzuki T. DOT1L histone methyltransferase regulates the expression of BCAT1 and is involved in sphere formation and cell migration of breast cancer cell lines. *Biochimie*. April 2016;123:20–31.
413. Naidu SR, Capitano M, Ropa J, Cooper S, Huang X, Broxmeyer HE. Chromatin remodeling subunit BRM and valine regulate hematopoietic stem/progenitor cell function and self-renewal via intrinsic and extrinsic effects. *Leukemia*. March 2022;36(3):821–833.
414. Wilkinson AC, Morita M, Nakauchi H, Yamazaki S. Branched-chain amino acid depletion conditions bone marrow for hematopoietic stem cell transplantation avoiding amino acid imbalance-associated toxicity. *Exp Hematol*. July 2018;63:12-16.e1.
415. Lee PY, Sykes DB, Ameri S, Kalaitzidis D, Charles JF, Nelson-Maney N, et al. The metabolic regulator mTORC1 controls terminal myeloid differentiation. *Sci Immunol*. May 26, 2017;2(11):eaam6641.
416. Karmaus PWF, Herrada AA, Guy C, Neale G, Dhungana Y, Long L, et al. Critical roles of mTORC1 signaling and metabolic reprogramming for M-CSF-mediated myelopoiesis. *J Exp Med*. September 4, 2017;214(9):2629–2647.
417. Lin X, Tan S, Fu L, Dong Q. BCAT1 Overexpression Promotes Proliferation, Invasion, and Wnt Signaling in Non-Small Cell Lung Cancers. *Oncotargets Ther*. 2020;13:3583–3594.
418. Zou Z, Chen J, Liu A, Zhou X, Song Q, Jia C, et al. mTORC2 promotes cell survival through c-Myc-dependent up-regulation of E2F1. *J Cell Biol*. October 12, 2015;211(1):105–122.
419. Li K, Wang F, Yang Z, Zhang T, Yuan Y, Zhao C, et al. TRIB3 promotes MYC-associated lymphoma development through suppression of UBE3B-mediated MYC degradation. *Nat Commun*. December 2020;11(1):6316.
420. Tang J, Yan T, Bao Y, Shen C, Yu C, Zhu X, et al. LncRNA GLCC1 promotes colorectal carcinogenesis and glucose metabolism by stabilizing c-Myc. *Nat Commun*. August 2, 2019;10(1):3499.
421. Tu R, Kang W, Yang M, Wang L, Bao Q, Chen Z, et al. USP29 coordinates MYC and HIF1 $\alpha$  stabilization to promote tumor metabolism and progression. *Oncogene*. November 2021;40(46):6417–6429.
422. Su R, Dong L, Li C, Nachtergaele S, Wunderlich M, Qing Y, et al. R-2HG Exhibits Anti-tumor Activity by Targeting FTO/m6A/MYC/CEBPA Signaling. *Cell*. January 2018;172(1–2):90-105.e23.
423. Muto T, Guillaumot M, Yeung J, Fang J, Bennett J, Nadorp B, et al. TRAF6 functions as a tumor suppressor in myeloid malignancies by directly targeting MYC oncogenic activity. *Cell Stem Cell*. February 2022;29(2):298-314.e9.
424. Palam LR, Mali RS, Ramdas B, Srivatsan SN, Visconte V, Tiu RV, et al. Loss of epigenetic regulator TET2 and oncogenic KIT regulate myeloid cell transformation via PI3K pathway. *JCI Insight*. February 22, 2018;3(4):e94679.
425. Oktay Y, Ülgen E, Can Ö, Akyerli CB, Yüksel Ş, Erdemgil Y, et al. IDH-mutant glioma



- specific association of rs55705857 located at 8q24.21 involves MYC deregulation. *Sci Rep*. June 10, 2016;6:27569.
426. Yanchus C, Drucker KL, Kollmeyer TM, Tsai R, Winick-Ng W, Liang M, et al. A noncoding single-nucleotide polymorphism at 8q24 drives IDH1-mutant glioma formation. *Science*. October 7, 2022;378(6615):68–78.
427. Dong Y, Tu R, Liu H, Qing G. Regulation of cancer cell metabolism: oncogenic MYC in the driver's seat. *Signal Transduct Target Ther*. December 2020;5(1):124.
428. Yue M, Jiang J, Gao P, Liu H, Qing G. Oncogenic MYC Activates a Feedforward Regulatory Loop Promoting Essential Amino Acid Metabolism and Tumorigenesis. *Cell Rep*. December 2017;21(13):3819–3832.
429. CRUK Rosetta Grand Challenge Consortium, Najumudeen AK, Ceteci F, Fey SK, Hamm G, Steven RT, et al. The amino acid transporter SLC7A5 is required for efficient growth of KRAS-mutant colorectal cancer. *Nat Genet*. January 2021;53(1):16–26.
430. Ben-Yosef T, Eden A, Benvenisty N. Characterization of murine BCAT genes: Bcat1, a c-Myc target, and its homolog, Bcat2. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc*. July 1998;9(7):595–597.
431. Benvenisty N, Leder A, Kuo A, Leder P. An embryonically expressed gene is a target for c-Myc regulation via the c-Myc-binding sequence. *Genes Dev*. December 1, 1992;6(12b):2513–2523.
432. Schuldiner O, Eden A, Ben-Yosef T, Yanuka O, Simchen G, Benvenisty N. ECA39, a conserved gene regulated by c-Myc in mice, is involved in G1/S cell cycle regulation in yeast. *Proc Natl Acad Sci*. July 9, 1996;93(14):7143–7148.
433. Zheng Y-H, Hu W-J, Chen B-C, Grahn T-H-M, Zhao Y-R, Bao H-L, et al. BCAT1, a key prognostic predictor of hepatocellular carcinoma, promotes cell proliferation and induces chemoresistance to cisplatin. *Liver Int*. December 2016;36(12):1836–1847.
434. Calkhoven CF, Müller C, Leutz A. Translational control of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression. *Genes Dev*. August 1, 2000;14(15):1920–1932.
435. Zidek LM, Ackermann T, Hartleben G, Eichwald S, Kortman G, Kiehntopf M, et al. Deficiency in mTORC1-controlled C/EBPβ-mRNA translation improves metabolic health in mice. *EMBO Rep*. August 2015;16(8):1022–1036.
436. Sabatier M, Boet E, Zaghoudi S, Guiraud N, Hucteau A, Polley N, et al. Activation of Vitamin D Receptor Pathway Enhances Differentiating Capacity in Acute Myeloid Leukemia with Isocitrate Dehydrogenase Mutations. *Cancers*. October 19, 2021;13(20):5243.
437. Boutzen H, Saland E, Larrue C, de Toni F, Gales L, Castelli FA, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 mutations prime the all-trans retinoic acid myeloid differentiation pathway in acute myeloid leukemia. *J Exp Med*. April 4, 2016;213(4):483–497.
438. Pulikkan JA, Tenen DG, Behre G. C/EBPα deregulation as a paradigm for leukemogenesis. *Leukemia*. November 2017;31(11):2279–2285.
439. Zhang P, Iwasaki-Arai J, Iwasaki H, Fenyus ML, Dayaram T, Owens BM, et al. Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha. *Immunity*. December 2004;21(6):853–863.
440. Avellino R, Delwel R. Expression and regulation of C/EBPα in normal myelopoiesis and in malignant transformation. *Blood*. April 13, 2017;129(15):2083–2091.
441. Di Tullio A, Vu Manh TP, Schubert A, Castellano G, Månsson R, Graf T. CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP(alpha))-induced transdifferentiation of pre-B cells into macrophages involves no overt retrodifferentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. October 11, 2011;108(41):17016–17021.
442. Laiosa CV, Stadtfeld M, Xie H, de Andres-Aguayo L, Graf T. Reprogramming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells by C/EBP alpha and PU.1

- transcription factors. *Immunity*. November 2006;25(5):731–744.
443. Chen X, Zhou W, Song R-H, Liu S, Wang S, Chen Y, et al. Tumor suppressor CEBPA interacts with and inhibits DNMT3A activity. *Sci Adv*. January 28, 2022;8(4):eabl5220.
444. Pabst T, Mueller BU, Zhang P, Radomska HS, Narravula S, Schnittger S, et al. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein- $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ), in acute myeloid leukemia. *Nat Genet*. March 2001;27(3):263–270.
445. Tyner JW, Tognon CE, Bottomly D, Wilmot B, Kurtz SE, Savage SL, et al. Functional genomic landscape of acute myeloid leukaemia. *Nature*. October 2018;562(7728):526–531.
446. Kirstetter P, Schuster MB, Bereshchenko O, Moore S, Dvinge H, Kurz E, et al. Modeling of C/EBP $\alpha$  mutant acute myeloid leukemia reveals a common expression signature of committed myeloid leukemia-initiating cells. *Cancer Cell*. April 2008;13(4):299–310.
447. Keeshan K, Santilli G, Corradini F, Perrotti D, Calabretta B. Transcription activation function of C/EBP $\alpha$  is required for induction of granulocytic differentiation. *Blood*. August 15, 2003;102(4):1267–1275.
448. Heyes E, Schmidt L, Manhart G, Eder T, Proietti L, Grebien F. Identification of gene targets of mutant C/EBP $\alpha$  reveals a critical role for MSI2 in CEBPA-mutated AML. *Leukemia*. September 2021;35(9):2526–2538.
449. Jakobsen JS, Laursen LG, Schuster MB, Pundhir S, Schoof E, Ge Y, et al. Mutant CEBPA directly drives the expression of the targetable tumor-promoting factor CD73 in AML. *Sci Adv*. July 2019;5(7):eaaw4304.
450. Nowak U, Janik S, Marchwicka A, Łaskiewicz A, Jakuszek A, Cebrat M, et al. Investigating the Role of Methylation in Silencing of VDR Gene Expression in Normal Cells during Hematopoiesis and in Their Leukemic Counterparts. *Cells*. August 29, 2020;9(9):E1991.
451. Paubelle E, Zylbersztejn F, Maciel TT, Carvalho C, Mupo A, Cheok M, et al. Vitamin D Receptor Controls Cell Stemness in Acute Myeloid Leukemia and in Normal Bone Marrow. *Cell Rep*. January 21, 2020;30(3):739–754.e4.
452. Nurminen V, Neme A, Seuter S, Carlberg C. Modulation of vitamin D signaling by the pioneer factor CEBPA. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul Mech*. January 2019;1862(1):96–106.
453. Warwick T, Schulz MH, Günther S, Gilsbach R, Neme A, Carlberg C, et al. A hierarchical regulatory network analysis of the vitamin D induced transcriptome reveals novel regulators and complete VDR dependency in monocytes. *Sci Rep*. March 22, 2021;11(1):6518.
454. Puccetti E, Obradovic D, Beissert T, Bianchini A, Washburn B, Chiaradonna F, et al. AML-associated translocation products block vitamin D(3)-induced differentiation by sequestering the vitamin D(3) receptor. *Cancer Res*. December 1, 2002;62(23):7050–7058.
455. Koschmieder S, D'Alò F, Radomska H, Schöneich C, Chang JS, Konopleva M, et al. CDDO induces granulocytic differentiation of myeloid leukemic blasts through translational up-regulation of p42 CCAAT enhancer binding protein  $\alpha$ . *Blood*. November 15, 2007;110(10):3695–3705.
456. Fellmann C, Hoffmann T, Sridhar V, Hopfgartner B, Muhar M, Roth M, et al. An Optimized microRNA Backbone for Effective Single-Copy RNAi. *Cell Rep*. December 2013;5(6):1704–1713.
457. Corces-Zimmerman MR, Hong W-J, Weissman IL, Medeiros BC, Majeti R. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proc Natl Acad Sci*. February 18, 2014;111(7):2548–2553.
458. Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, Chen WC, Brandwein JM, Gupta V, et al.

- Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature*. February 20, 2014;506(7488):328–333.
459. Shlush LI, Mitchell A, Heisler L, Abelson S, Ng SWK, Trotman-Grant A, et al. Tracing the origins of relapse in acute myeloid leukaemia to stem cells. *Nature*. July 2017;547(7661):104–108.
460. Shlush LI. Age-related clonal hematopoiesis. *Blood*. February 1, 2018;131(5):496–504.
461. Wiseman DH, Williams EL, Wilks DP, Sun Leong H, Somerville TDD, Dennis MW, et al. Frequent reconstitution of IDH2R140Q mutant clonal multilineage hematopoiesis following chemotherapy for acute myeloid leukemia. *Leukemia*. September 2016;30(9):1946–1950.
462. Batsios G, Viswanath P, Subramani E, Najac C, Gillespie AM, Santos RD, et al. PI3K/mTOR inhibition of IDH1 mutant glioma leads to reduced 2HG production that is associated with increased survival. *Sci Rep*. December 2019;9(1):10521.
463. Huang Y, Su R, Sheng Y, Dong L, Dong Z, Xu H, et al. Small-Molecule Targeting of Oncogenic FTO Demethylase in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell*. April 2019;35(4):677-691.e10.
464. Qing Y, Dong L, Gao L, Li C, Li Y, Han L, et al. R-2-hydroxyglutarate attenuates aerobic glycolysis in leukemia by targeting the FTO/m6A/PFKP/LDHB axis. *Mol Cell*. March 4, 2021;81(5):922-939.e9.
465. Tahmasebi S, Khoutorsky A, Mathews MB, Sonenberg N. Translation deregulation in human disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. December 2018;19(12):791–807.
466. Cho S, Lee G, Pickering BF, Jang C, Park JH, He L, et al. mTORC1 promotes cell growth via m6A-dependent mRNA degradation. *Mol Cell*. May 20, 2021;81(10):2064-2075.e8.
467. Villa E, Sahu U, O'Hara BP, Ali ES, Helmin KA, Asara JM, et al. mTORC1 stimulates cell growth through SAM synthesis and m6A mRNA-dependent control of protein synthesis. *Mol Cell*. May 20, 2021;81(10):2076-2093.e9.

**Titre :** Caractéristiques métaboliques et moléculaires des leucémies aiguës myéloïdes (LAM) avec mutations isocitrate déshydrogénase (IDH)

**Mots clés :** Leucémie aiguë myéloïde, isocitrate déshydrogénase, différenciation, épigénétique, métabolisme des acides aminés branchés, BCAT1

**Résumé :** La leucémie aiguë myéloïde (LAM) est une hémopathie caractérisée par un blocage de différenciation de progéniteurs/précurseurs myéloïdes. Les mutations affectant les gènes *isocitrate déshydrogénase 1 et 2 (IDH1/2)*, présentes dans 20-25% des LAM, entraînent la production d'un oncométabolite, le D-2-hydroxyglutarate (D-2HG), responsable de perturbations épigénétiques et métaboliques.

Nous avons identifié une activité anormale de la voie des acides aminés branchés (branched-chain amino acid, BCAA correspondant aux acides aminés essentiels valine, leucine, isoleucine) dans les cellules primaires de LAM avec mutation *IDH2*, favorisant l'anabolisme de la leucine, voie essentiellement catabolique dans les cellules tumorales. La production de leucine est liée à la surexpression du gène *BCAT1*, contrôlant le métabolisme des BCAA, par perte d'un mécanisme de répression transcriptionnelle dépendant de la marque H3K27me3 en présence de mutations *IDH2*.

L'inhibition génomique (shRNA) et pharmacologique de *BCAT1*, diminue fortement la croissance cellulaire des blastes leucémiques avec mutation *IDH2*, *in vitro* et dans des modèles murins PDX. Cette inhibition s'accompagne également de l'engagement en différenciation myéloïde des cellules avec anomalie *IDH2*. Nous avons aussi identifié un lien fonctionnel entre les activités de *BCAT1*, du complexe mTORC1 et de la traduction du facteur de transcription CEBP $\alpha$ , un régulateur majeur de la différenciation myéloïde.

Notre étude révèle une reprogrammation métabolique de la voie des BCAA des cellules leucémiques avec mutation *IDH2*, régulant les processus de différenciation et de prolifération cellulaire. L'inhibition de cette voie métabolique dans les LAM avec mutation *IDH2*, pourrait constituer une stratégie thérapeutique pertinente.

**Title :** Metabolic and molecular characteristics of acute myeloid leukemia (AML) with isocitrate dehydrogenase (IDH) mutations

**Keywords :** Acute myeloid leukemia, isocitrate dehydrogenase, differentiation, epigenetic, branched chain amino acids metabolism, BCAT1

**Abstract :** Acute myeloid leukemia (AML) is a hematological disorder characterized by a differentiation block of myeloid progenitors/precursors. Mutations in *isocitrate dehydrogenase 1 and 2 (IDH1/2)* genes, found in 20-25% of AML, result in the production of an oncometabolite, D-2-hydroxyglutarate (D-2HG), responsible for epigenetic and metabolic perturbations.

We have identified an abnormal activity of the branched-chain amino acid (BCAA) pathway (corresponding to the essential amino acids valine, leucine, isoleucine) in primary AML cells with *IDH2* mutation, favoring leucine anabolism, a pathway that is essentially catabolic in tumor cells. Leucine production is linked to the up-regulation of *BCAT1* gene, controlling BCAA metabolism, by loss of an H3K27me3-dependent transcriptional repression mechanism in the presence of *IDH2* mutation.

Genomic (shRNA) and pharmacological inhibition of *BCAT1*, strongly decreases cell growth of leukemic blasts with *IDH2* mutation, *in vitro* and in PDX mouse models. This inhibition is also accompanied by the commitment to myeloid differentiation of mutant *IDH2* cells. We also identified a functional link between activities of *BCAT1*, mTORC1 complex and translation of the CEBP $\alpha$  transcription factor, a major regulator of myeloid differentiation.

Our study reveals a metabolic reprogramming of the BCAA pathway in leukemic cells with *IDH2* mutation, regulating cell differentiation and proliferation processes. Inhibition of this metabolic pathway in *IDH2*-mutated AML could be a relevant therapeutic strategy.