



HAL
open science

Implication du facteur d'initiation de la traduction eIF4E3 dans l'hématopoïèse normale et dans la leucémie aiguë myéloïde

Cécile Soum

► **To cite this version:**

Cécile Soum. Implication du facteur d'initiation de la traduction eIF4E3 dans l'hématopoïèse normale et dans la leucémie aiguë myéloïde. Cancer. Université de Toulouse, 2024. Français. NNT : 2024TLSES029 . tel-04681342

HAL Id: tel-04681342

<https://theses.hal.science/tel-04681342>

Submitted on 29 Aug 2024

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.

Doctorat de l'Université de Toulouse

préparé à l'Université Toulouse III - Paul Sabatier

Implication du facteur d'initiation de la traduction eIF4E3 dans
l'hématopoïèse normale et dans la leucémie aiguë myéloïde

Thèse présentée et soutenue, le 26 janvier 2024 par

CECILE SOUM

École doctorale

BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies

Spécialité

CANCEROLOGIE

Unité de recherche

CRCT - Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse

Thèse dirigée par

Stéphane PYRONNET

Composition du jury

Mme Catherine MULLER, Présidente, Université Toulouse - Paul Sabatier

M. Sylvain LEFORT, Rapporteur, INSERM de Lyon - CRCL

Mme Virginie MARCEL, Rapporteur, INSERM de Lyon - CRCL

Mme Marie-Laure ARCANGELI, Rapporteur, INSERM Paris - Institut Gustave Roussy

M. Stéphane PYRONNET, Directeur de thèse, INSERM de Toulouse - CRCT

REMERCIEMENTS

Je souhaite commencer par remercier mon jury de thèse, le Dr. Virginie MARCEL, le Dr. Marie-Laure ARCANGELI, le Dr Catherine MULLER et le Dr Sylvain LEFORT, pour avoir accepté d'évaluer mon travail et de m'avoir apporté de précieux conseils qui ont permis d'enrichir mon manuscrit. Je vous remercie également pour les différents échanges et pour les discussions enrichissantes que l'on a eus et qui ont contribué à faire avancer ce projet.

Je souhaite remercier le Dr Stéphane Pyronnet de m'avoir donné ma chance en m'acceptant en stage de M2 et de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans l'équipe. Merci pour votre aide précieuse, votre optimisme et vos conseils qui m'ont permis d'avancer sur mon projet. Merci également pour toutes vos petites anecdotes et histoires toujours enrichissantes.

Je remercie aussi également le pôle technologique du CRCT pour leur aide précieuse. Merci à Loïc Van Der Bergue et Typhaine Fraineau, un grand merci à Manon Farce pour ton implication, ton aide et tous tes précieux conseils en cytométrie. Merci également à Emeline Sarrot d'avoir pris le temps d'échanger sur eIF4E3 et d'avoir débroussaillé ce projet !!

Merci également à toute l'équipe 6 pour votre accompagnement concernant mes débuts dans la recherche. Je remercie tous les membres de l'équipe 7, où j'ai eu la chance de pouvoir poursuivre ma thèse. Merci pour tous ces moments partagés autour d'un verre ou de quelques shooters !!

Je souhaite remercier Fabienne, merci pour ton aide et tes conseils scientifiques et surtout pour tes conseils gustatifs et tes bonnes idées de restau !

Merci Marina pour ton aide essentielle sur ce projet et d'avoir partagé tes précieuses données qui ont contribué à l'avancée de mon projet. Bon courage pour la fin de thèse de Ahmed et Romain, à l'énergie (un peu trop) débordante surtout à partir de 17 heures. Je compte sur toi pour faire des gâteaux tigres maintenant que tu as une super recette !!

Merci Alex pour tes précieux conseils scientifiques, ta sympathie et merci d'avoir mis ta casquette de gendarme pour le bien-être du labo ! J'espère que tu seras épanoui dans ta future carrière en tant que bio-informaticien, je te souhaite le meilleur dans ce nouveau challenge, pas sportif cette fois !

Elissa, merci pour ta gentillesse et tous ces moments de partage et de découverte autour de quelques gâteaux et recettes libanaises. Je te souhaite bon courage pour cette fin de thèse qui sera riche en émotions.

Loélia, j'espère que tu continueras à mettre des robes plus souvent malgré que je ne sois plus là pour te forcer !! Continue d'apprendre des superbes expressions, partage ta culture de l'anorak et du mojito. Seul le rhum aura eu raison de ton énergie débordante.

Steffen, merci pour ta présence et de ton apport, par ta joie de vivre et ta bonne humeur chaque jour au labo. Continue d'apprendre quand même quelques-unes de nos superbes expressions. Je te souhaite le meilleur pour ta nouvelle vie pleine de nouvelles aventures.

Romain, je veux te remercier pour tous ces moments de rires, ces soirées partagées autour d'un verre ou sur la piste de danse. Je n'oublie pas ma mission, ne t'inquiète pas on va se revoir quand tu feras MAPR !!! J'ai passé de bons moments avec toi, avec parfois de longs débats, mais ce fut un plaisir de te rencontrer quand tu étais encore un petit garçon !! Ahmed, ma pépette adorée, on aura bien rigolé, alors merci pour ta bonne humeur, ton rire qui raisonne partout. Avec toi c'est un peu la vie en rose au labo !! Par contre calmos sur le vol de stylos et surtout sur le deal, tous les acheteurs ne seront pas aussi sympathiques que moi ! Alors, merci à vous deux pour tous ces moments de folie partagés, et on n'oublie pas : tout ce qui se passe en culture reste en culture. Je sais que l'on va vous manquer, vous n'aurez plus personne à embêter surtout à partir de 17 heures. Ces années de labo ont quand même été bien sympathiques avec vous et on se sera bien amusé, parfois un peu trop peut-être !

Marine, seulement quelques mois partagés ensemble, mais je te remercie pour ta légèreté et ta joie de vivre chaque jour ! Les pauses et les petits massages cheveux étaient bien sympa. Je te souhaite le meilleur pour ta nouvelle vie canadienne, profite bien de cette aventure.

Guillaume ou plutôt Guigui, des débuts pas très bavards mais au final tu as su t'intégrer à notre bureau de fille. Merci d'avoir partagé notre bureau, merci pour ta patience, et surtout d'avoir partagé des pauses café même quand tu n'en avais pas très envie.

Christian et Laurent, un très grand merci à vous deux pour tout ce que vous avez fait durant ces quelques années de thèse. Tout d'abord un énorme merci pour votre aide scientifique plus qu'essentielle, qui a répondu de nombreuses fois à mes interrogations. Mais surtout merci d'être vous, votre bonne humeur, votre bienveillance, votre gentillesse et surtout votre

soutien à chaque épreuve ont rendu ces années au labo bien plus sympathiques. Vos blagounettes et vos anecdotes vont me manquer ! Vous êtes de belles rencontres et des personnes en or ! Je penserai à vous à chaque vernis accompagné d'un petit rhum ou liqueur de banane (mais pas que) ! Ce n'est qu'un aurevoir, on se revoit vite autour de quelques verres.

Chloé, merci pour tout ! Tu as toujours été là avec tes conseils, ta bienveillance de maman, ta bonne humeur. Tu as su nous remonter le moral quand on n'était vraiment pas au top de la forme « A quoi bon la vie » comme on pouvait le dire un peu trop souvent !! Tu as été une super rencontre, on va continuer à se faire des petites soirées à Montpellier maintenant !!

Sandra, même si parfois tu ne comprends pas tout, on a vraiment partagé de bons moments. Merci pour ton aide précieuse, ton soutien et tes superbes diapos. Je sais que le jeté de bonbons te manque vraiment ! Je vais continuer de t'embêter autour d'un repas ou d'un verre pour pouvoir profiter encore un peu de ta joie de vivre !

Cathy ou plutôt ma Catchou, que de choses à te dire, ce serait bien trop long mais un grand merci de m'avoir pris sous ton aile dès mon arrivée au labo. Tu auras joué tous les rôles durant ces années au labo. Tu m'auras fait découvrir tes astuces pour les WB ou comment déposer ces fichues billes et surtout j'ai découvert la Romarine (notre QG) pour partager de nombreux beaux moments !

Amandine, je tiens particulièrement à te remercier. Tu es celle qui m'a donné le goût pour la recherche et tu m'as tout appris. Si tu n'avais pas été là pour me former, me conseiller et m'épauler durant mon stage et mon début de thèse, jamais je n'en serais là aujourd'hui. Alors un grand merci pour ta gentillesse, ta douceur et ta bienveillance.

Un énorme merci à tout mon entourage pour ce soutien inestimable durant toutes ces années. Je remercie particulièrement mes ami(e)s, mes proches et ma famille d'avoir été présents chaque jour et surtout le jour J.

Ma Lalie d'amour, je te donne tous les mercis et toute la reconnaissance que je peux ! Tu sais déjà tout mais un énorme merci d'avoir été là, jour et nuit pour ton soutien. J'ai commencé ma thèse un peu seule et je repars avec une super amie. Que te dire, ce serait bien trop long, on a tout vécu, tout partagé et tout fait ensemble. Maintenant on a enfin fini, on va pouvoir

continuer à tout partager mais sans « A quoi bon la vie » !! Certains seront encore jaloux de notre amour mais ça, ça ne se contrôle pas.

Elia, ma copine d'amour, beaucoup de choses à te dire mais surtout un grand merci à toi pour ton soutien permanent durant toutes ces années et surtout de m'accueillir à chaque fois que j'en avais besoin (souvent un peu au dernier moment). Merci aussi à Cyril qui accepte de me prêter son canapé et à ma Léonie d'amour avec qui j'ai pu m'amuser et faire pleins de câlins pour décompresser pendant ces durs moments ! On va enfin pouvoir profiter ensemble et partager de beaux moments.

Je tiens également à remercier mes supers copines Marine et Chloé (et leur chéri). Marine tu partages ma vie depuis de très nombreuses années maintenant, tu as toujours été là pour partager de nombreuses étapes de ma vie, alors merci pour ton soutien. Et ma Chloé on se connaît depuis quelques années maintenant et tu as toujours su me donner du courage par tes petits mots et ta bienveillance. Merci à vous deux d'avoir toujours été là pour moi, de m'avoir soutenu et encouragé et de m'avoir souvent attendu pour faire nos petites soirées !! Maintenant à nous les apéros et les petits repas !!

Merci ma Marjo d'avoir toujours été là depuis plusieurs années maintenant. On a pu se soutenir, se comprendre et s'aider dans cette épreuve pas si facile. Bravo à toi aussi pour l'obtention de ce doctorat bien mérité, on va enfin pouvoir se voir un peu plus !!

Camille et Baptiste, je veux vous remercier pour votre soutien en ce jour si important et difficile à la fois. Merci pour tous ces moments que l'on a pu partager grâce à votre venue sur Toulouse. Promis maintenant c'est à nous de venir vous voir, on va pouvoir profiter de pleins de bons moments !!!

Merci ma Mymy pour ton soutien et tes petits messages de courage pendant ces années pas faciles. Tu as toujours les bons mots, tu es toujours là pour tout le monde avec ton sourire et ta bonne humeur alors merci ! Maintenant ça y est je vais être libre comme l'air pour partager plus souvent un petit verre avec toi, que l'on ne payera pas bien sûr !!

Merci à Sylvie, David, Laurine et mon petit Jojo pour votre soutien et votre présence en ce jour si important. Tant de moments partagés avec vous depuis de nombreuses années, cela m'a fait énormément plaisir de vous avoir près de moi pour marquer la fin de cette aventure.

Je tiens également à remercier mes proches qui partagent mon quotidien depuis maintenant de nombreuses années ; les Teams Arakelian, Harpoutian, Nicolas, Laurens et Warnecke, un énorme merci, pour tout votre soutien, votre bienveillance et vos encouragements pendant ces années de travail.

Je tiens à remercier toute la Team Soum, pour m'avoir soutenue dans ce projet pas si facile, d'avoir toujours cru en moi ! Merci pour les petits moments d'évasion, de partage et de bonheur qui m'ont permis de tenir durant toutes ces années de travail !! Maintenant on va pouvoir profiter, je vous prépare le programme des activités à venir et je vous assure que ça va être génial !

Je tiens également à remercier Jean-Philippe et Domi, Sevan et Thomas pour avoir toujours été là pour moi depuis maintenant 15 ans. Merci pour votre soutien sans faille, votre bienveillance et vos encouragements. Vous avez toujours été présent pour franchir ces différentes étapes depuis quelques années maintenant, alors merci à vous. Maintenant on va enfin pouvoir profiter de pleins de moments en famille !

Le plus grand des mercis revient à mes grands-parents, mais surtout à mes parents, ma sœur et Axel qui ont, chaque jour, été là pour moi. Sans vous je n'en serais pas là aujourd'hui, vous m'avez donné la chance de pouvoir réaliser mes rêves et aujourd'hui si j'ai pu valider cette thèse c'est grâce à vous. Vous avez été le plus grand des soutiens et j'ai pu trouver le réconfort que j'avais besoin dans les moments les plus durs. Alors juste merci d'être vous et d'avoir toujours cru en moi.

Maxime, il n'y a pas assez de mots pour te remercier d'avoir été présent au quotidien depuis toutes ces années. Tu es mon pilier de chaque jour, mon meilleur coéquipier, tu sais déjà tout, je n'aurais pas pu avoir un meilleur soutien que toi. Merci pour ta patience, surtout lors de nos balades nocturnes, pour ton aide précieuse et tes encouragements. Tu as endossé tous les rôles et tu m'as aidé au mieux dans cette aventure pas si facile parfois. Maintenant de nouveaux projets s'offrent à nous, notre nouvelle vie va enfin pouvoir commencer !

Et pour finir, Merci à vous tous d'avoir été là pour partager ce jour de soutenance et de délivrance tant attendu !

SOMMAIRE

Table des illustrations.....	11
Table des abréviations.....	12
Introduction.....	14
Partie I : L'hématopoïèse normale	14
I- Généralités	14
II- Organisation de la niche hématopoïétique.....	15
III- Auto-renouvellement et multipotence : caractéristiques des CSH.....	16
IV- Les étapes clés de l'hématopoïèse :.....	17
1) Schéma « classique » de l'arbre hématopoïétique	17
2) Du schéma classique de l'hématopoïèse vers un continuum progressif	19
3) Caractérisation phénotypique des cellules hématopoïétiques.....	21
V- Le passage d'un état de repos vers une activation des CSH	22
1) Dormance et activation des CSH	22
2) Le rôle important du métabolisme des CSH.....	23
3) Régulateurs impliqués dans l'activation des CSH.....	25
VI- Contrôle de la niche des CSH par différents facteurs extrinsèques.....	26
1) Maintien de l'état de repos des CSH	26
2) Les facteurs de la niche orientent la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques	27
VII- Auto-renouvellement des CSH et différenciation par les facteurs de transcription.....	28
1) Régulation du pool des cellules souches hématopoïétiques	28
2) Différenciation des progéniteurs myéloïdes : GMP ou MEP ?.....	29
3) Différenciation des GMP : granulocytes ou monocytes ?.....	29
4) Différenciation des MEP : érythrocytes ou mégacaryocytes ?.....	30
VIII- Régulation post-transcriptionnelle et traductionnelle de l'expression génique.....	31
Partie II : Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM).....	33
I- Définition :.....	33
II- Epidémiologie :.....	33
III- Facteurs de risques :.....	34
IV- Symptômes et diagnostic	35
V- Classification des LAM :.....	35
VI- Les altérations génétiques.....	41
VII- Les stratégies thérapeutiques de la LAM	52

1) Le traitement de référence :	52
2) « Schéma de sauvetage »	55
a) Candidat à un traitement intensif	56
b) Non candidat à un traitement intensif	56
3) Alternative au traitement de référence (chimiothérapie intensive) :	57
4) Les thérapies ciblées	59
Les Inhibiteurs de FLT3 :	59
Les Inhibiteurs IDH 1 et IDH 2 :	60
Les Inhibiteurs de l'apoptose :	61
5) L'immunothérapie	61
Inhibiteurs des points de contrôle immunitaire :	61
Les Anticorps conjugués à un médicament :	62
Les Anticorps bispécifiques :	62
Les cellules CAR-T :	63
Les vaccins :	63
6) Les agents différenciants	63
L'acide tout trans-rétinoïque (ATRA) :	63
La vitamine D :	65
VIII- Transformation maligne et développement des LAM	67
Partie III : Contrôle de l'initiation de la traduction	71
I- Généralités	71
II- Modifications post-transcriptionnelles	71
1) L'épissage de l'ARN :	72
2) La coiffe	72
3) La polyadénylation :	72
III- Traduction IRES dépendante	73
IV- La traduction cap-dépendante	73
1) La formation du complexe de pré-initiation 43S	76
Complexe ternaire et de pré-initiation 43S	76
Le facteur eIF2 :	77
2) Le complexe d'initiation de la traduction	77
Le complexe eIF4F :	77
eIF4G :	78
eIF4A :	79
3) Le facteur d'initiation de la traduction eIF4E	79
a) Le facteur d'initiation eIF4E1	80

Généralités et fonctions du facteur eIF4E1	80
Régulation d'eIF4E1 par sa phosphorylation.....	81
Régulation négative d'eIF4E1 :	82
Régulation d'eIF4E1 par les voies de signalisation	82
Les fonctions nucléaires d'eIF4E1 :	85
b) Le facteur d'initiation eIF4E2.....	85
c) Le facteur d'initiation eIF4E3 :	85
Généralités du facteur eIF4E3	85
Les fonctions du facteur eIF4E3	87
4) Traduction et cancer.....	90
L'implication d'eIF4E1 dans le cancer	90
Dérégulation des voies de signalisation	90
Dérégulation de facteurs de transcription	91
Rôle nucléaire d'eIF4E1 dans le cancer	92
L'implication d'eIF4E3 dans le cancer	92
Contexte et objectif.....	94
Résultats	96
I- Matériel et méthodes.....	96
II- Facteur d'initiation de la traduction eIF4E versus eIF4E3 : Article 1.....	101
1) Résultats expérimentaux.....	101
2) Discussion/Perspectives	116
III- Facteur d'initiation de la traduction et signalisation des MAPK	120
1) Résultats expérimentaux.....	120
2) Discussion / Perspectives	124
IV- Signalisation PI3K-AKT-mTOR : Article 2.....	126
Discussion générale	144
Conclusion générale	149
Références.....	151

Table des illustrations

Figure 1 : Schéma « classique » de l'hématopoïèse normale	18
Figure 2 : Schéma de l'hématopoïèse normale : un continuum progressif	19
Figure 3 : Caractérisation phénotypique des cellules hématopoïétiques murines et humaines.....	21
Figure 4 : Régulation de la différenciation myéloïde par des facteurs de transcription essentiels.....	31
Figure 5 : Taux d'incidence selon la classe d'âge en France en 2018.....	34
Figure 6 : Les différents sous-types de LAM d'après la classification FAB	37
Figure 7 : Principaux marqueurs de surface utilisés pour la caractérisation des sous-types de LAM d'après l'ELN 2022	38
Figure 8 : Classification des LAM selon les recommandations de l'ELN 2022 d'après les anomalies génétiques en différents groupes de pronostics.....	39
Figure 9 : Classification des LAM selon les recommandations de l'OMS 2022	40
Figure 10 : Classification des altérations génétiques en 9 groupes d'après les cohortes du TCGA.....	43
Figure 11 : La mutation NPM1 associée avec d'autres altérations génétiques dans la LAM.....	44
Figure 12 : La mutation FLT3 associée avec d'autres altérations génétiques dans la LAM	45
Figure 13 : Les mutations NRAS et KIT associées avec d'autres altérations génétiques dans la LAM ..	46
Figure 14 : Les mutations CEBP- α et RUNX1 associées avec d'autres altérations génétiques dans la LAM	46
Figure 15 : Les fusions de gènes associées avec d'autres altérations génétiques dans la LAM.....	48
Figure 16 : La mutation TP53 associée avec d'autres altérations génétiques dans la LAM.....	49
Figure 17 : Les mutations DNMT3, IDH et TET2 associée avec d'autres altérations génétiques dans la LAM	50
Figure 18 : La fusion MLLT3-KMT2A et la mutation KMT2A associées avec d'autres altérations génétiques dans la LAM	52
Figure 19 : Schéma de la thérapie d'induction dans le traitement des LAM	53
Figure 20 : Schéma de la thérapie de consolidation dans le traitement des LAM.....	54
Figure 21 : Schéma de « sauvetage » dans le traitement des LAM.....	57
Figure 22 : Alternative au traitement de référence des LAM	58
Figure 23 : Les différentes stratégies thérapeutiques alternatives au traitement de référence dans les LAM	66
Figure 24 : La transformation du système hématopoïétique sain vers la malignité et le développement des LAM.	70
Figure 25 : Représentation de la coiffe m7GTP à l'extrémité 5' de l'ARNm	72
Figure 26 : Schéma général de la traduction cap-dépendante	75
Figure 27 : Le complexe eIF4F	78
Figure 28 : Structure générale d'eIF4G et les sites d'interactions avec les autres facteurs d'initiation	79
Figure 29 : Structure cristallographique d'eIF4E1	80
Figure 30 : La régulation du complexe d'initiation de la traduction eIF4F par les voies de signalisation des MAPK et de PI3K-AKT.....	84
Figure 31 : Structure cristallographique d'eIF4E3	86
Figure 32 : Les différentes interactions des facteurs d'initiation de la traduction	89

Table des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique	GATA1 : Guanine-Adenine-Thymine-Adenine binding protein 1
AFDN : Afadin, adherens junction formation factor	GATA2 : Guanine-Adenine-Thymine-Adenine binding protein 2
Ang-1 : Angiopoïétine 1	GATA 3 : Guanine-Adenine-Thymine-Adenine binding protein 3
AraC : Aracytine	G-CSF : Granulocytes Colony Stimulating Factor
ARN : Acides ribonucléiques	GDP : Guanosine Di-Phosphate
ARNm : ARN messenger	GEF : Guanosine Exchange Factor
ARNt : ARN de transfert	GM-CSF : Granulocytes- Macrophages Colony Stimulating Factor
ATO : Arsenic tri oxyde	GMP : Granulo- Monocytic Progenitor
ATP : Adénosine triphosphate	GO : Gemtuzumab Ozogamicine
ATRA : All Trans Retinoic Acid	GTP : Guanosine Tri-Phosphate
BCL-2 : B-cell lymphoma 2	H3K4 : histone 3 lysine 4
BiTE : anticorps bispécifiques	HAT : histone acétyltransférases
CBC : Cap Binding Complex	HDAC : histone désacétylases
CBF-α : core binding factor- α	HIF-2α : Hypoxia inducible factor 2 α
CBFβ : Core Binding Factor subunit beta	IDH : Isocitrate Dehydrogenase
CAR : Cellule Réticulaire Abondante	IL-7 : Interleukine 7
CAR-T : Chimeric Antigenic Receptor-T	IL-3 : Interleukine 3
CD : Cluster de Différenciation	IRES : Internal Ribosome Entry Site
C/EBPα : CCAAT Enhancer Binding Protein α	ITD : Internal Tandem Duplication
CLL-1 : Chemokine (C-C motif) ligand 1	JAG-1 : Jagget-1
CLP : Common Lymphoid Progenitor	JAK : Just Another Kinase
CMP : Common Myeloid Progenitor	KMT2A : Lysine Methyltransferase 2A
CSF3R : colony stimulating factor 3 receptor	LAM : Leucémie Aiguë Myéloïde
CSH : Cellule Souche Hématopoïétique	LAP : Leucémie Aiguë Promyélocytaire
CSL : Cellules Souches Leucémiques	LMPP : Lymphoid primed pluripotent progenitor
CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4	LT-HSC : Long Term Hematopoietic Stem Cell
CXCL 12 : CXC Ligand 12	MAPK : Mitogen-activated protein kinases
CXCR4 : Récepteur de CXCL-12	M-CSF : Macrophages Macrophage colony-stimulating factor
DNMT3A : DNA Methyl-Transferase 3A	MEP : Megakaryo- Erythrocytic Progenitor
DMSO : Diméthylsulfoxyde	MGG : coloration May-Grünwald Giemsa
eEF : eukaryotic elongation factor	MLL2 : Mixed-Lineage Leukemia Translocated To chromosome 3 protein
eIF4E -BP : eIF4E-Binding Proteins	MLP : Multi-lymphoid progenitor
eEF2K : eEF2 kinase	MNK : MAPK-interacting kinase
eIF : eukaryotic translation Initiation Factor	MPO : Myélopéroxydase
EKLF : erythroid Kruppel-like factor	MPP : Multipotent Progenitor
ELN : European LeukemiaNet	MRD : Maladie Résiduelle Mesurable
EMA : Agence Européenne des Médicaments	mTOR : Mammalian Target Of Rapamycin
eRF : eukaryotic termination factor	MYH11 : Myosin Heavy Chain 11
FAB : Franco-Américano-Britannique	
FCS : Facteur des cellules souches	
FDA : Food and Drug Administration	
FLI-1 : Friend leukemia integration 1 transcription factor	
FLT3 : Fms-Like Tyrosine kinase 3	

NADP : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
Phosphate
NFS : Numération de la Formule Sanguine
NF-kB : nuclear factor-kappa B
NK : Natural Killer
NPM1 : Nucléophosmine 1
NUP98 : nuclear pore complex protein Nup98
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PABP : PolyA Binding Protein
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
PDK1 : pyruvate déshydrogénase kinase 1
PIC : complexe de pré-initiation
PIP : phosphatidylinositol
PKC : protein kinase C
PMA : phorbol 12-myristate 13-acetate
PML : Promyelocytic leukemia protein
PTD : partial tandem duplications
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
PTPMT1 : Protein tyrosine phosphatase
mitochondrial 1
RARA : Retinoic Acid Receptor Alpha
RARE : Retinoic Acid Response Element
ROS : reactive oxygen species
p70S6 kinase : Ribosomal protein S6 kinase
rpS6 : ribosomal protein S6
RUNX1 : Runt-related transcription factor 1
RXR : retinoid X receptor
SCF : Stem Cell Factor
SMC1A : Structural Maintenance Of
Chromosomes 1A
SMC3 : Structural Maintenance Of
Chromosomes 3
ST-HSC : Short Term Hematopoietic Stem Cell
STAG2 : Stromal Antigen 2
STAT : signal transducer and activator of
transcription
TCGA : The Cancer Genome Atlas
TET2 : Ten-Eleven Translocation 2
Tie2 : tyrosine kinase with immunoglobulin
TGF-β : Transforming growth factor
Th1 : T helper 1
Th2 : T helper 2
TKD : Tyrosine Kinase Domain
TPA : 12- O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate
VDR : récepteur à la vitamine D
VEGF : Vascular endothelial growth factor
Trp : tryptophane (W)
WT1 : Wilm's tumor 1

Introduction

Partie I : L'hématopoïèse normale

I- Généralités

L'hématopoïèse est un processus finement régulé qui est à l'origine de la fabrication de l'ensemble des cellules sanguines. C'est un phénomène physiologique, dynamique et continu qui assure la production quotidienne de plusieurs milliards de cellules sanguines et permet le maintien de l'homéostasie du tissu sanguin. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) se situent au sommet de l'hématopoïèse et sont à l'origine de toutes les cellules qui constituent notre système hématopoïétique. Les CSH se trouvent au sein de la moelle osseuse, le siège de l'hématopoïèse. La moelle osseuse est un organe complexe composé de cellules hématopoïétiques interconnectées par un réseau vasculaire et innervé ¹. Elle se trouve dans les os plats (sternum, os iliaques, vertèbres, crâne) et principalement dans la partie proximale des os longs. Elle se divise en moelle jaune (adipeuse) et en moelle rouge lieu de l'hématopoïèse ¹. Outre la moelle osseuse et le sang, le système hématopoïétique se compose de différents organes comme le thymus, la rate, les ganglions, etc.

Le terme « cellules souches » a été utilisé pour la première fois en 1868 par Ernst Haeckel, ce terme fût utilisé pour parler d'organisme unicellulaire dont serait issu l'ensemble des organismes multicellulaires. Mais c'est en 1961 que les cellules souches ont été caractérisées par James Till et Ernest McCulloch d'après des études sur les effets des rayonnements sur la moelle osseuse de souris ². L'injection de cellules de moelle osseuse entraîne la formation de colonies dans la rate de souris, constituées de différents types de cellules sanguines. La poursuite de leurs travaux ³ a permis de définir les CSH comme ayant des propriétés d'auto-renouvellement, de multipotence et de différenciation. En effet les CSH, grâce à leurs propriétés de multipotence, sont capables de donner toutes les cellules matures du sang mais également de maintenir un pool de cellules souches.

En effet les cellules qui composent notre sang ont une durée de vie limitée ; un à trois jours pour les granulocytes, une semaine pour les plaquettes, quatre mois pour les hématies, quelques mois pour les monocytes et quelques mois à plusieurs années pour les lymphocytes

T et B. La production continue de cellules sanguines est nécessaire pour permettre le renouvellement du système hématopoïétique. Il est donc essentiel de maintenir un pool de CSH capable de renouveler de façon permanente toutes les cellules de notre système sanguin. Les CSH se situent dans un environnement protégé appelé « niche », ce micro-environnement permet le maintien des cellules souches. Ce terme a été évoqué pour la première fois en 1978 par Schofield ⁴. Cette dernière permet le maintien d'un pool de cellules dans un état de quiescence, non différencié et multipotent. Ces cellules ont une capacité d'auto-renouvellement mais également de différenciation. L'hématopoïèse est un processus régulé afin de maintenir un équilibre entre l'auto-renouvellement des CSH et l'engagement de ces cellules en différenciation pour produire tous les différents types de cellules sanguines. Les CSH vont se diviser de manière symétrique et/ou asymétrique en produisant une cellule souche qui permet le maintien du pool de CSH et une cellule qui va pouvoir proliférer et se différencier en différents types cellulaires. Cet équilibre est primordial et permet la pérennité de l'hématopoïèse ⁵.

II- Organisation de la niche hématopoïétique

La niche hématopoïétique reste encore un vaste débat, mais plusieurs études décrivent l'existence de deux niches hématopoïétiques : une niche endostéale et une niche vasculaire. La niche des CSH peut être définie comme une structure spatiale ^{5,6}.

La niche endostéale se situe à proximité de la muqueuse endo-osseuse. On retrouve un pool de CSH dormantes avec un potentiel d'auto-renouvellement illimité. Les CSH dormantes sont le sommet de l'hématopoïèse et représentent une réserve de cellules souches au repos qui pourra être sollicitée sous l'effet d'un stress, d'une lésion, ou encore pour maintenir l'homéostasie. Les CSH dormantes sont en contact avec les ostéoblastes qui tapissent la surface endostéale de l'os (revêtement cellulaire interne des cavités osseuses), et également en contact avec des cellules mésenchymateuses, des cellules réticulaires abondantes (CAR) en CXCL-12 (C-X-C Ligand 12 ou SDF-1 (stromal cell derived factor 1)), des fibroblastes stromaux et potentiellement d'autres cellules comme des ostéoclastes. Ce micro-environnement maintient l'état souche des cellules et par conséquent une dormance à long terme. Cet état souche est aussi favorisé grâce à un environnement en hypoxie et une matrice extracellulaire dense. En réponse à un stress ou pour maintenir l'homéostasie, les CSH dormantes pourraient sortir de leur niche pour rejoindre la niche vasculaire. Fait intéressant, une fois que les cellules

souches ont joué leurs rôles, les CSH reviennent à la dormance, cela suggère que les CSH passent de manières réversibles de la dormance à l'auto-renouvellement une fois l'homéostasie rétablie ⁷. De plus l'état de repos des cellules souches permet de préserver le potentiel d'auto-renouvellement afin de prévenir l'épuisement des cellules souches ^{8,9}.

La niche vasculaire est la deuxième niche décrite qui est en contact étroit avec l'endothélium des sinusoides. Au sein de cette niche on retrouve des CSH qui vont être activées, c'est-à-dire des cellules avec des capacités d'auto-renouvellement plus limitées mais capables de se différencier pour donner naissance aux progéniteurs multipotents (MPP). Au sein de cette niche, on retrouve des cellules CAR périvasculaires près des sinusoides formant la niche vasculaire et également des cellules endothéliales. Ces cellules rejoindront la circulation à travers l'endothélium fenestré (vaisseaux de basse pression).

III- Auto-renouvellement et multipotence : caractéristiques des CSH

Les CSH se caractérisent par leur capacité à générer un large spectre de cellules sanguines tout en donnant naissance à de nouvelles CSH après division cellulaire grâce à un processus appelé auto-renouvellement ¹⁰. Les CSH sont capables de s'auto-renouveler indéfiniment soit par division symétrique ou asymétrique afin de conserver un pool de CSH constant. Par leurs capacités à se diviser les cellules donnent naissance à des cellules identiques avec les mêmes potentiels de développement. La division symétrique génère deux cellules filles identiques, avec soit deux CSH ou alors deux progéniteurs qui pourront se différencier en cellules matures.

Il est communément admis qu'une cellule souche individuelle peut également donner naissance à deux cellules filles non identiques, on parle alors de division asymétrique. Ce mécanisme permet au CSH de donner une cellule fille souche et un progéniteur (MPP) qui se différenciera en tous les types de cellules sanguines. Il existe deux mécanismes par lesquels cette division va se produire ⁵.

- Asymétrie divisionnaire : division de la cellule en deux cellules filles non identiques par polarisation de la cellule, l'une conserve les déterminants d'une cellule souche alors que l'autre va entrer en différenciation ¹¹.
- Asymétrie environnementale : division symétrique en deux cellules filles, le destin de ces cellules est dû au microenvironnement, une des cellules filles conserve son destin

de cellule souche en restant dans un environnement de niche alors que la deuxième cellule fille va entrer en contact avec un environnement permettant d'initier la différenciation ¹².

Une autre caractéristique qui définit les CSH est la multipotence. Il s'agit de la capacité des cellules à se différencier en tous les types de cellules qui constituent notre système hématopoïétique.

IV- Les étapes clés de l'hématopoïèse :

1) Schéma « classique » de l'arbre hématopoïétique

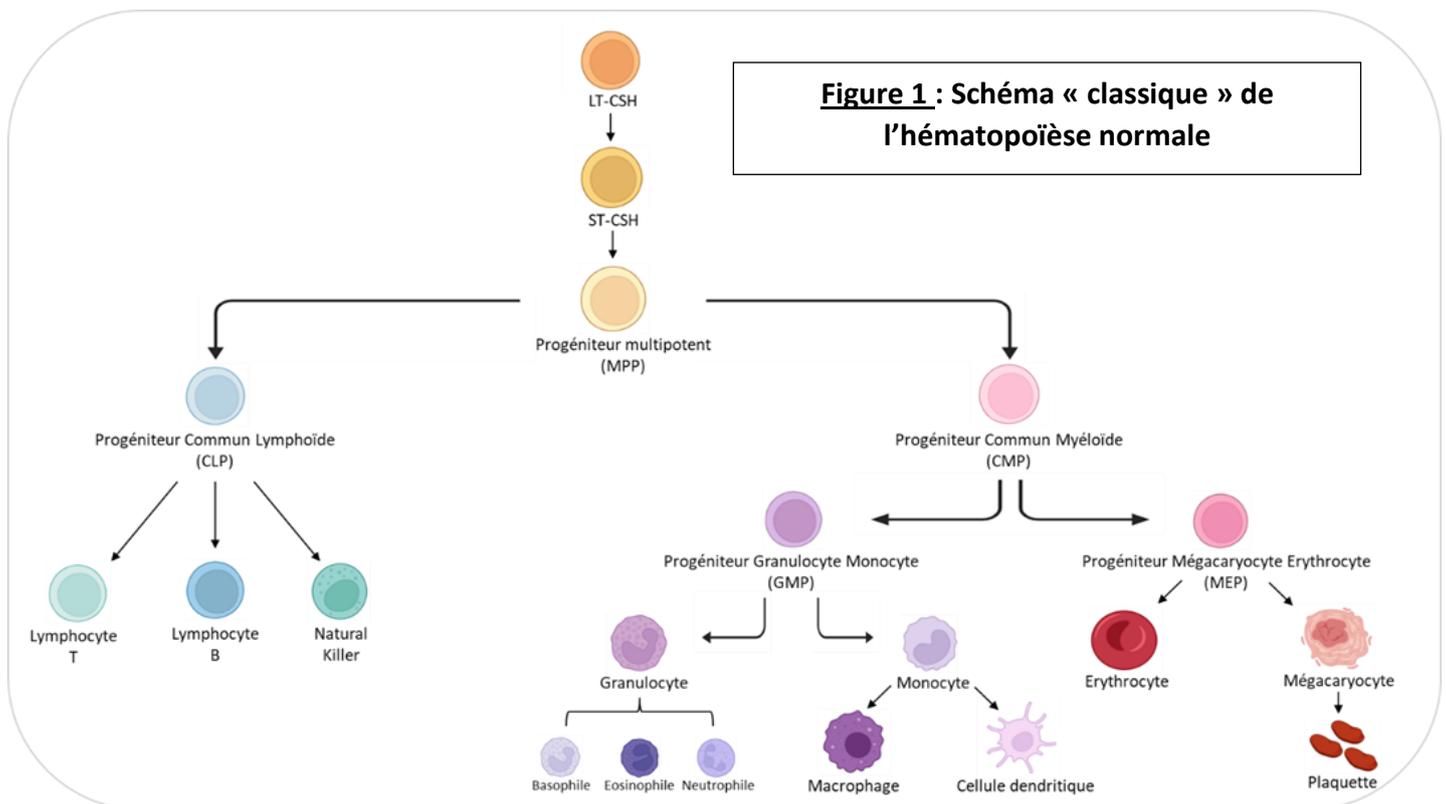
L'hématopoïèse est classiquement représentée sous forme d'un arbre, où se trouve au sommet les cellules les plus indifférenciées aux propriétés multipotentes. Ces cellules prolifèrent, se divisent, perdent en multipotence et se différencient en cellules matures et fonctionnelles.

Les CSH sont le commencement de l'hématopoïèse ¹³. On distingue deux sous types de cellules souches : les LT-HSC et les ST-HSC ^{14,15}.

Les Long-term hematopoietic stem cell (LT-HSC) : ce sont des CSH de « long terme » c'est-à-dire des cellules quiescentes avec un faible pouvoir prolifératif mais un fort potentiel d'auto-renouvellement illimité. Lorsque ces cellules sortent de leur état de quiescence, elles vont s'auto-renouveler afin de maintenir un pool de cellules souches multipotentes et/ou donner des ST-CSH capables, elles, de produire toutes les cellules hématopoïétiques matures qui composent notre sang.

Les short term hematopoietic stem cell (ST-HSC) possèdent des capacités prolifératives élevées mais perdent leurs capacités d'auto-renouvellement. Ces cellules acquièrent des capacités prolifératives plus importantes mais perdent en auto-renouvellement. Ces cellules se différencient en progéniteurs multipotents (MPP). Les progéniteurs conservent leurs propriétés de multipotence, ce qui leur permet de se différencier en plusieurs types cellulaires mais leurs capacités à s'auto-renouveler s'amenuisent au cours de la différenciation.

Les MPP vont eux donner soit des progéniteurs myéloïdes communs (CMP) ¹⁶ soit des progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) ¹⁷. Les CLP sont à l'origine des lymphocytes T et B ainsi que des cellules Natural Killer (NK). Alors que les CMP se différencient en progéniteur commun granulocyte-monocyte (GMP) et en progéniteur mégacaryocyte érythrocyte (MEP). Les GMP donneront les granulocytes (basophiles, neutrophiles et éosinophiles) et les monocytes qui sont à l'origine des macrophages et cellules dendritiques (Figure 1). Les MEP sont à l'origine des érythrocytes (globules rouges) et des mégacaryocytes qui donneront par la suite les plaquettes. Les globules blancs ou leucocytes représentent les cellules immunitaires et sont en charge de l'immunité innée et adaptative de notre corps, les érythrocytes permettent le transport de l'oxygène et les plaquettes sont à l'origine de la coagulation du sang et la cicatrisation des tissus.

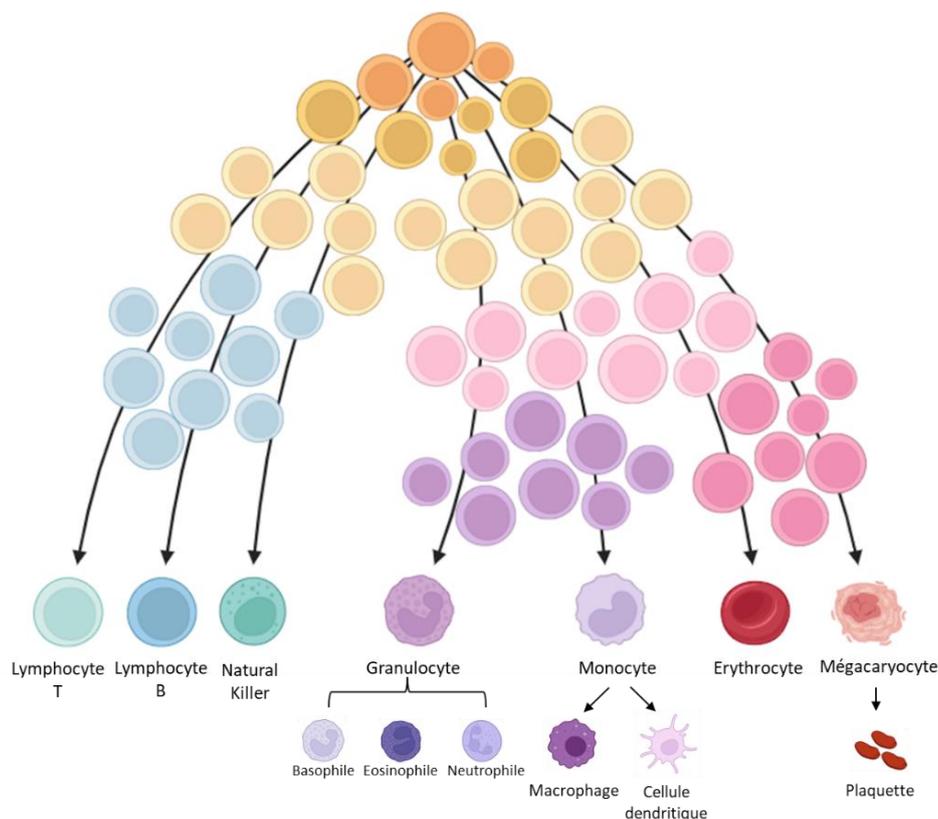


Le modèle dit « classique » de l'hématopoïèse repose sur un modèle arborescent et hiérarchique avec au sommet les CSH multipotentes donnant naissance à leurs progéniteurs puis aux cellules matures à travers une série d'étapes ordonnées. Le destin cellulaire est déterminé à chaque étape et suggère des sous-populations homogènes.

2) Du schéma classique de l'hématopoïèse vers un continuum progressif

Bien que ce modèle classique soit encore utilisé aujourd'hui, de nouvelles données de « cellule unique » ont mis en évidence un nouveau modèle de l'hématopoïèse défini comme un continuum progressif^{18,19} (Figure 2). Ce modèle de différenciation continue démontre une population de CSH ainsi que des sous-populations de progéniteurs hétérogènes (MPP) avec une différenciation progressive. La séparation entre chaque sous-population est moins nette et se caractérise par des états transitoires plutôt que des points de ramification bien définis. Ce nouveau modèle se définit par l'acquisition d'un programme d'expression génique impliqué dans la différenciation progressive et continue des cellules²⁰. De plus, il semblerait que le destin cellulaire puisse être défini dès les premiers stades de la différenciation hématopoïétique. En effet, une équipe a mis en évidence que les mégacaryocytes pourraient provenir directement des CSH²¹. Cela suggère que le destin cellulaire est dicté très tôt dans le processus hématopoïétique.

Figure 2 : Schéma de l'hématopoïèse normale : un continuum progressif



Grâce à l'avènement des nouvelles technologies, des précisions sont apportées concernant l'arbre hématopoïétique. Ainsi, chez la souris quatre sous-populations de MPP sont identifiées ; de **MPP1** à **MPP4** ^{7,22,23}. Les MPP1 sont phénotypiquement et fonctionnellement proches des CSH et semblent être un sous-ensemble métaboliquement actif de CSH. Les MPP2 et MPP3 sont orientés dans le lignage myéloïde alors que les MPP4 sont engagés dans le lignage lymphoïde. La production de MPP à tendance myéloïde est rare et se fait de manière transitoire afin de régénérer le tissu hématopoïétique. De plus, les MPP4 peuvent subir une reprogrammation et être redirigés vers la lignée myéloïde en fonction des besoins et des stimuli comme avec l'IL-6 par exemple ²³. Ce modèle dynamique de l'hématopoïèse permet de s'adapter rapidement afin de répondre aux besoins de l'organisme. Les sous-ensembles de MPP sont produits par les CSH de façon indépendante et avec des cinétiques différentes en fonction des besoins. L'existence de quatre sous populations de MPP a été mise en évidence chez la souris mais chez l'homme il semblerait donc que les MPP soit une population hétérogène.

3) Caractérisation phénotypique des cellules hématopoïétiques

L'ensemble des cellules hématopoïétiques (murines et humaines) peut être caractérisé grâce à la présence de marqueurs à la surface des cellules ^{7,23,24,27}(Figure 3). Au fil des années, de nouveaux marqueurs sont mis en lumière chez la souris et également chez l'homme. Nous ferons un inventaire non exhaustif des marqueurs de surface, en ne citant que les plus communs. L'antigène de différenciation lin est exprimé au cours de la différenciation des cellules murines et humaines. Le phénotype murin **LSK** correspond à Lin-Sca1+cKit+. Les CSH murines sont identifiées grâce à la présence du marqueur **CD150** et l'absence de **CD48** ²⁸. Chez l'homme tous les progéniteurs possèdent le marqueur **CD34** et n'expriment pas l'antigène de différenciation Lin. Le marqueur **CD38** est absent des progéniteurs les plus immatures et est exprimé au cours de la différenciation cellulaire. Le marqueur **CD45RA** est exprimé par la lignée lymphoïde mais par les cellules myéloïdes. Les marqueurs **CD11b** et **CD14** sont utilisés pour identifier la différenciation des cellules en monocytes.

Figure 3 : Caractérisation phénotypique des cellules hématopoïétiques murines et humaines

Sous-type cellulaire	Phénotype murin
LT-CSH	Lin- Sca1+ kit+ (LSK) CD34-/CD150+/CD48- /CD135-
ST-CSH	Lin- Sca1+ kit+ (LSK) CD34-/CD150+/CD48- /CD135+
MPP1	Lin- Sca1+ kit+ (LSK) CD34+/CD150+/CD48- /CD135-
MPP2	Lin- Sca1+ kit+ (LSK) CD34+/CD150+/CD48+/CD135-
MPP3	Lin- Sca1+ kit+ (LSK) CD34+/CD150-/CD48+ /CD135-
MPP4	Lin- Sca1+ kit+ (LSK) CD34+/CD150-/CD48+/CD135+

Légende :
Lin- : absence de différenciation
SCA-1 : stem cell antigen 1
cKit : récepteur tyrosine kinase
DC135 : FLT3
CD49f : intégrine α6
CD90 : THY1.1 (thymocyte differentiation antigen 1)

Sous-type cellulaire	Phénotype humain
LT-CSH	Lin-/CD34+/CD38-/CD45RA-/CD49f+/CD90+
ST-CSH	Lin-/CD34+/CD38-/CD45RA-/CD49f+/CD90+
MPP	Lin-/CD34+/CD38-/CD45RA-/CD49f-/CD90-/CD10-/CD7-
MLP	Lin-/CD34+/CD38-/CD45RA+/CD10+/CD7-
CLP	Lin-/CD34+/CD38+/CD45RA+/CD10+
CMP	Lin-/CD34+/CD38+/CD45RA-/CD10-/CD7-
MEP	Lin-/CD34+/CD38+/CD45RA-/CD10-/CD7-
GMP	Lin-/CD34+/CD38+/CD45RA+/CD10-/CD7-

V- Le passage d'un état de repos vers une activation des CSH

1) Dormance et activation des CSH

La quiescence des cellules est un état de cycle cellulaire et de repos métabolique qui protège les CSH de l'épuisement. Le terme d'épuisement du système hématopoïétique est utilisé lorsque le nombre ou la fonction des CSH est compromis en raison d'un renouvellement exacerbé, résultant d'une forte demande de reconstitution en cas de stress par exemple. La quiescence des cellules permet de protéger le pool de cellules souches établies, contrôle l'épuisement de ce pool de cellules et permet donc la production des cellules hématopoïétiques tout au long de la vie ⁷. Des perturbations de la quiescence des cellules souches induisent une prolifération aberrante des CSH et conduisent à l'épuisement du compartiment des CSH. L'état de repos des cellules (en phase G0) permet de lutter contre l'instabilité génomique, les dommages à l'ADN et également contre le stress métabolique et répliatif ²⁹. Les CSH utilisent différents mécanismes pour faire face aux différents stress intrinsèques et environnementaux afin de lutter contre l'accumulation de dommage à l'ADN. Une bonne exécution des mécanismes de réparation de l'ADN est essentielle au fonctionnement normal des CSH. Dans des conditions d'état d'équilibre, les CSH constituent une population cellulaire en grande partie calme, à cycle lent, qui, en réponse à des signaux environnementaux, est capable d'une expansion afin d'assurer un remplacement homéostatique approprié des cellules sanguines. Il est identifié des CSH profondément dormantes capables de transiter de façon progressive vers des CSH actives. Les CSH dormantes et actives sont toutes deux dans un état quiescent, cependant les CSH actives sont prêtes à rentrer en cycle cellulaire de façon rapide. Des régulateurs majeurs sont exprimés de manières différentielles dans les cellules dormantes et actives. Ils participent soit au maintien de la dormance soit à l'engagement des cellules souches dans le cycle cellulaire.

En fonction des besoins de l'organisme, l'état de repos et l'activation des CSH sont régulés par un ensemble de signaux intrinsèques et extrinsèques. Par exemple, en réponse à un stress (inflammation, perte de sang par exemple) ou pour maintenir l'homéostasie, les CSH au repos (en phase G0) peuvent être activées et entrer en cycle cellulaire pour s'autorenouveler ou se différencier. L'**activation des CSH** est essentielle pour le maintien du tissu hématopoïétique. Les CSH transitent de façon progressive d'un état de dormance vers un état activé ³⁰. La synthèse protéique, les changements métaboliques ainsi que l'augmentation des composants

liée au cycle cellulaire définit le passage progressif de l'état de dormance vers l'état actif. Bien que ces CSH s'activent, elles ne sont pas encore entrées en cycle cellulaire et sont considérées comme au repos ou cellules quiescentes. Les cellules souches dans un état actif sont prêtes pour rentrer en cycle cellulaire rapidement, en revanche les cellules dormantes sont dans un état de quiescence profonde avec une faible activité biosynthétique. Les cellules dormantes mettent beaucoup plus de temps que les CSH dans un état actif à rentrer en cycle cellulaire et de ce fait les cellules dormantes ont un potentiel de reconstitution à long terme le plus élevé. La majorité des CSH adultes se trouve en phase G0 du cycle cellulaire c'est-à-dire dans un état de repos. En effet, deux tiers des LT-CSH ont été identifiées comme étant dans un état de repos³¹.

Pour résumer, l'activation des CSH est caractérisée par un changement progressif, à travers une série d'état cellulaire intermédiaire afin de préparer les cellules à l'entrée en cycle cellulaire. Afin de quitter l'état de repos, toutes les machineries du métabolisme et du cycle cellulaire doivent être réactivées. L'activation des cellules est dictée par l'expression de régulateurs favorisant l'entrée en cycle, la prolifération et la différenciation des cellules.

2) Le rôle important du métabolisme des CSH

Les CSH dormantes se retrouvent dans une niche hypoxique à proximité de l'endoste nécessitant une adaptation métabolique des cellules. Le métabolisme des CSH au repos dépend de la **glycolyse anaérobie**³² essentiellement, de l'autophagie et d'une faible activité des mitochondries. Cet état métabolique favorise l'état de repos des CSH, maintient la capacité d'auto-renouvellement et évite l'épuisement des CSH. En revanche l'activation des CSH se caractérise par une activation du métabolisme dépendant de la **phosphorylation oxydative mitochondriale** (OXPHOS). Les CSH au repos possèdent un niveau élevé de mitochondries mais peu actives, cela garantit un engagement rapide de la phosphorylation oxydative mitochondriale pour répondre aux besoins énergétiques. De plus, l'autophagie régule et contrôle le métabolisme au repos des CSH. En effet l'autophagie bloque la phosphorylation oxydative des CSH en éliminant les mitochondries actives et saines afin de maintenir la quiescence et préserve la capacité d'auto-renouvellement des cellules³³. L'altération de l'autophagie³⁴ est associée à une accumulation de mitochondries et un état métabolique activé de façon exacerbé provoquant la différenciation cellulaire et une perte des capacités d'auto-renouvellement.

La protéine tyrosine phosphatase mitochondriale 1 (PTPMT1)³⁵ est un composant principal de la machinerie OXPHOS et est essentielle pour la différenciation des cellules. Le passage d'un état de repos (glycolyse anaérobie) à un état d'activation des CSH (OXPHOS) est essentiel et permet la régénération du système hématopoïétique. Ce changement métabolique est essentiel pour la prolifération et la différenciation des cellules et marquent **l'activation des CSH**. L'activation des CSH et les changements métaboliques sont essentiels pour fournir l'énergie nécessaire à la prolifération et à la différenciation des CSH. Ces mécanismes se produiraient dans une niche vasculaire où l'oxygène est disponible pour soutenir le métabolisme. Ces processus jouent un rôle dans le remodelage épigénétique comme la méthylation de l'ADN (méthyltransférase), la modification des histones (acétylation), le remodelage de la chromatine et participe également à l'activation de programmes de transcriptions spécifiques pour chaque lignée impliquée dans l'engagement en différenciation des CSH^{22,36}.

Lors de la respiration mitochondriale (OXPHOS), les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont produites, la production de ROS (sous-produit d'OXPHOS) est normale pour tous les organismes vivant en aérobie. Afin de contrôler la présence des ROS, la cellule dispose de différents complexes de détoxification des ROS. La réponse antioxydante peut se faire par des oxydoréductases, des molécules antioxydantes qui piègent et inactivent les radicaux libres. Certains facteurs de transcription comme FOXO sont des régulateurs clés de la réponse antioxydante et participent à l'élimination des ROS. L'accumulation de ROS entraîne une sortie de quiescence des CSH et active la voie de signalisation des MAPK (p38). L'activation de la voie p38-MAPK³⁷ en réponse à des niveaux croissants de ROS favorise la prolifération cellulaire, inhibe la quiescence des cellules et réduit les capacités d'auto-renouvellement des CSH. Un déséquilibre entre la production de ROS et les capacités antioxydantes des cellules engendre un stress oxydatif. Les systèmes de protection et d'élimination des ROS sont alors submergés, et la quantité importante de ROS devient alors pathologique. De plus, les ROS provoquent l'oxydation des nucléotides et des dommages à l'ADN qui sont réparés grâce à différents systèmes de réparation de l'ADN. Les capacités de réparation de l'ADN peuvent être dépassées et conduire à l'accumulation de dommages à l'ADN³⁸. Les voies de réparation de l'ADN sont également essentielles pour préserver l'intégrité de l'ADN, lors des processus répliatifs en condition physiologique mais également lors d'un stress cellulaire.

3) Régulateurs impliqués dans l'activation des CSH

Outre le changement métabolique, l'activation des CSH et l'entrée en cycle cellulaire sont dictées par l'expression de certains régulateurs. L'expression différentielle de certains acteurs contrôle la sortie de dormance et l'activation des CSH. La dormance des cellules est également maintenue par de faibles taux de traduction, de prolifération et en limitant l'augmentation des ROS, et l'expression de la protéine c-myc. En revanche, l'entrée en cycle cellulaire passe par une diminution des niveaux de p57 et une augmentation de l'expression des cyclines 4 et 6 (CDK4 et CDK6). De plus l'expression de c-myc et de ses gènes cibles est régulée positivement lorsque les cellules passent d'un état de dormance profonde à un état activé³⁰. L'expression de la cycline D6 est liée à un état cellulaire au repos, mais prêt pour l'entrée en cycle cellulaire de façon rapide. L'expression de la cycline D6 augmente progressivement dans les cellules activées et elle est également retrouvée dans les progéniteurs multipotents³⁹.

De façon générale, la synthèse des protéines et les composants liés au cycle cellulaire augmentent lorsque les CSH sortent de la dormance et se dirigent vers l'état actif. Bien que les CSH ne soient pas encore entrées dans le cycle cellulaire et soient donc toujours considérées comme au repos, elles sont déjà préparées à s'orienter vers des voies métaboliques liées au cycle cellulaire plus actives.

Pour résumer, les CSH au repos (dormantes) dépendent de la glycolyse anaérobie. L'environnement hypoxique permet de renforcer la quiescence des CSH et limite l'engagement des cellules dans un métabolisme actif, limite la respiration mitochondriale et la génération de ROS. En revanche lors de l'activation des CSH, le métabolisme cellulaire passe à la phosphorylation oxydative mitochondriale. L'activation des CSH est marquée par une augmentation du métabolisme cellulaire et par la régulation d'acteurs favorisant la prolifération et la différenciation⁴⁰. Le métabolisme joue le rôle d'un interrupteur ON/OFF permettant de faire passer les CSH d'un état au repos à un état activé capable de générer l'ensemble du système hématopoïétique. L'activation des CSH est essentielle, elle permet de maintenir l'homéostasie du tissu hématopoïétique. Par la suite différents facteurs extrinsèques ou intrinsèques viendront guider le devenir de chaque cellule afin de produire l'ensemble des cellules du système sanguin.

VI- Contrôle de la niche des CSH par différents facteurs extrinsèques

1) Maintien de l'état de repos des CSH

L'hématopoïèse est un processus finement contrôlé. Il est essentiel de maintenir un équilibre afin de préserver un pool de CSH tout en induisant la différenciation des CSH en cellules matures et fonctionnelles.

L'équilibre entre auto-renouvellement et différenciation des CSH dépend des interactions entre les CSH et des constituants de la niche hématopoïétique ¹. Cet équilibre est finement régulé par de nombreux facteurs. La niche et les cellules qui la composent fournissent des signaux qui soutiennent les propriétés des CSH ou au contraire des signaux permettant d'orienter la différenciation des cellules. Nous allons ici exposer seulement les régulateurs les plus importants.

Divers types de cellules de la moelle osseuse sont impliqués dans la régulation de la niche hématopoïétique et des CSH. On retrouve des cellules souches mésenchymateuses, des ostéoblastes, des cellules endothéliales, les cellules réticulaires (progéniteurs mésenchymateux), des adipocytes, des cellules gliales, des neurones ^{1,41}. De plus l'environnement hypoxique de la niche renforce l'état de repos des CSH et favorise l'auto-renouvellement.

Les progéniteurs mésenchymateux, les ostéoblastes et les cellules endothéliales expriment le ligand périvasculaire de la chimiokine CXCL-12 (CXCL-12 ou SDF-1) et produisent le facteur des cellules souches (SCF ou Kit-ligand) ⁴², composants cellulaires clés de la niche des CSH. Les cellules mésenchymateuses qui régulent l'expression de CXCL-12 sont principalement des cellules réticulaires abondantes en CXCL-12 (progéniteur mésenchymateux nommés CAR).

Le facteur des cellules souches se fixe sur son récepteur c-Kit (CD 117), un récepteur à tyrosine kinase, au niveau des CSH et est impliqué dans la quiescence des CSH.

Le principal récepteur de CXCL-12 est CXCR4 et la signalisation qui en découle est nécessaire pour le maintien d'un pool de CSH ⁴³. Il agit comme inhibiteur du statut cyclique des CSH afin de maintenir un pool de cellules quiescentes. Il joue un rôle crucial car il est impliqué dans la rétention, la quiescence et l'activité d'auto-renouvellement des CSH dans la moelle osseuse

⁴⁴.

Les CSH sont maintenues dans un état de repos et indifférenciées grâce à des interactions avec la niche. Les cellules mésenchymateuses (cellules stromales) de la moelle osseuse expriment JAM-B, une molécule d'adhésion jonctionnelle. Cette dernière interagit avec JAM-C exprimée sur les CSH. L'interaction entre JAM-B/JAM-C participe au maintien du pool des LT-CSH ⁴⁵⁻⁴⁷.

Les cellules mésenchymateuses vont également produire de l'angiopoïétine (Ang-1) et les CSH expriment le récepteur tyrosine kinase Tie2 ⁴⁸. La signalisation ang-1-Tie2 est impliquée dans le maintien des CSH dans un état de repos dans la niche endostéale. Cette signalisation favorise l'adhésion des CSH aux ostéoblastes présents dans la niche et maintient l'activité d'auto-renouvellement.

Les cellules gliales et plus particulièrement les cellules de Schwann non myélinisantes sont impliquées dans la régulation des CSH par production du facteur de croissance transformant (TGF- β) ^{49,50}. Ce facteur est aussi un acteur important puisqu'il participe au maintien de la quiescence des CSH.

Tous ces facteurs vont réguler directement ou indirectement un programme d'expression de gènes permettant le maintien au repos des CSH ou au contraire un programme concurrent afin d'orienter la différenciation des cellules.

2) Les facteurs de la niche orientent la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques

Les ostéoblastes régulent également la myélopoïèse normale, ils vont produire le facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF) dans la moelle osseuse ⁵¹. La production de ce facteur permet d'orienter la différenciation des progéniteurs myéloïdes présents au sein de la niche en granulocytes. Les cellules de la niche sont impliquées dans l'activation des CSH en réponse à une agression physiologique importante. Par exemple, en réponse à un pathogène, les cellules endothéliales sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que le **G-CSF** afin de piloter l'hématopoïèse d'urgence ⁵² pour répondre aux besoins de l'organisme.

Il a également été mis en évidence que les progéniteurs des granulocytes/macrophages sont régulés par des facteurs comme l'interleukine-3 (IL-3) et le GM-CSF (facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages), facteurs produits par des cellules du micro-environnement de la moelle osseuse ⁵³.

L'interleukine 7 (IL-7) est une cytokine sécrétée par les cellules stromales essentielle à la lymphopoïèse⁵⁴. Les précurseurs des lymphocytes vont acquérir au cours de leur maturation le récepteur à l'IL-7, permettant une régulation sélective de ces cellules, en effet les CSH ne présentent pas ce récepteur^{55,56}.

Il s'agit de quelques exemples non exhaustifs des facteurs impliqués dans le contrôle de la niche hématopoïétique et qui vont influencer le destin des progéniteurs.

La régulation des progéniteurs hématopoïétiques et leurs différenciations en différents types cellulaires dépendent de ces régulations extrinsèques citées précédemment mais également de l'activation de programmes d'expression génique spécifiques de chaque sous-type cellulaire, régulés par des facteurs de transcription⁵⁷.

VII- Auto-renouvellement des CSH et différenciation par les facteurs de transcription

1) Régulation du pool des cellules souches hématopoïétiques

Le maintien dans un état de repos indifférencié des CSH est également régulé par des facteurs de transcription qui vont contrôler positivement ou négativement l'expression des gènes. Le facteur de transcription FOXO3 joue un rôle central dans le maintien du pool de CSH. Une étude a mis en évidence que FOXO3 régule l'expression de p21, p27 et p57⁵⁸, régulateurs clés du cycle cellulaire. Une inhibition de ce facteur réduit l'expression de régulateurs négatifs du cycle cellulaire entraînant un défaut de quiescence des CSH. Le facteur de transcription **FOXO3** est également un régulateur clé de la réponse antioxydante. Les cellules déficientes en FOXO3 présentent une augmentation importante des ROS et engendrent une perte de leur quiescence ainsi qu'un défaut de la capacité d'auto-renouvellement réduite^{59,60}. L'augmentation des ROS engendre une activation accrue de la voie de signalisation des MAPK (p38) favorisant la prolifération et différenciation cellulaire. FOXO3 pilote également un programme favorisant l'autophagie des CSH, processus essentiel au maintien de l'auto-renouvellement des CSH⁶¹.

Le facteur de transcription 1α (**HIF1- α**) est stabilisé dans les CSH par une faible teneur en oxygène (hypoxie). Il régule le métabolisme des CSH (LT-CSH) au repos grâce à l'utilisation de la glycolyse anaérobie³².

2) Différenciation des progéniteurs myéloïdes : GMP ou MEP ?

Le facteur PU-1 est un facteur essentiel dans la différenciation myéloïde. Alors que le facteur GATA-1 est lui essentiel dans la différenciation des mégacaryocytes et érythrocytes. Ces deux facteurs de transcription vont réguler l'expression des gènes au niveau des CMP. En fonction de l'expression des gènes, les progéniteurs se différencieront en GMP ou MEP.

GATA-1 est un facteur de transcription à doigt de zinc, c'est un médiateur central de l'expression de gènes permettant la différenciation des cellules en érythroïdes et mégacaryocytes. Autre fait intéressant, GATA-1 et PU-1 s'antagonisent l'un et l'autre, c'est-à-dire que, par exemple, quand PU-1 est exprimé, il réprime GATA-1 et inversement⁶². La surexpression de Pu-1 bloque la maturation des érythrocytes en bloquant la fixation de GATA-1 à l'ADN et est à l'origine du développement d'érythroleucémies. Cela s'explique par l'antagonisme croisé de PU-1 et GATA-1.⁶³ Un knockdown (KO) de GATA-1 chez la souris est létal et entraîne une anémie sévère avec un arrêt de la maturation des érythroïdes/mégacaryocytes. Au niveau des progéniteurs myéloïdes communs, l'antagonisme Pu-1/GATA-1 oriente la différenciation en GMP ou en MEP.

3) Différenciation des GMP : granulocytes ou monocytes ?

Le facteur de transcription C/EBP- α est nécessaire à la formation de granulocytes alors que Pu-1 favorise la différenciation monocyttaire. PU-1 est un facteur important car il régule l'expression de nombreux gènes.

La régulation de l'hématopoïèse est une balance, l'expression plus forte d'un facteur de transcription par rapport à un autre va orienter le devenir de la cellule, et cela peut également être soutenu par l'expression dans le micro-environnement de cytokines.

Des expériences ont été réalisées pour évaluer le rôle de PU-1 et de C/EBP- α , les résultats ont démontré que la concentration de PU-1 ou de C/EBP- α régule le destin des cellules. En effet une expression plus faible de PU-1 favorise une différenciation granulocytaire alors qu'une forte expression de PU-1 oriente les cellules vers une différenciation monocyttaire. La balance entre PU-1 et C/EBP- α oriente le destin des cellules en favorisant l'expression des gènes spécifiques. De fortes concentrations en C/EBP- α bloquent la capacité de PU-1 à se fixer sur des promoteurs permettant la différenciation monocyttaire alors qu'une concentration élevée de PU-1 par rapport à C/EBP- α permet de surmonter l'inhibition de ce dernier. Il a aussi été

mis en évidence que la cytokine G-CSF participe à la régulation positive de C/EBP- α , facteur impliqué dans la myélopoïèse et plus précisément dans la différenciation des cellules en granulocyte. Ces données démontrent que le G-CSF peut diriger la différenciation des granulocytes en induisant C/EBP α , qui à son tour active les gènes cibles des granulocytes et réprime la différenciation des macrophages induite par PU-1⁶⁴. En effet, par ses domaines de transactivation, C/EBP- α régule l'expression du gène CSF3R (colony stimulating factor 3 receptor) qui code pour le récepteur au G-CSF.

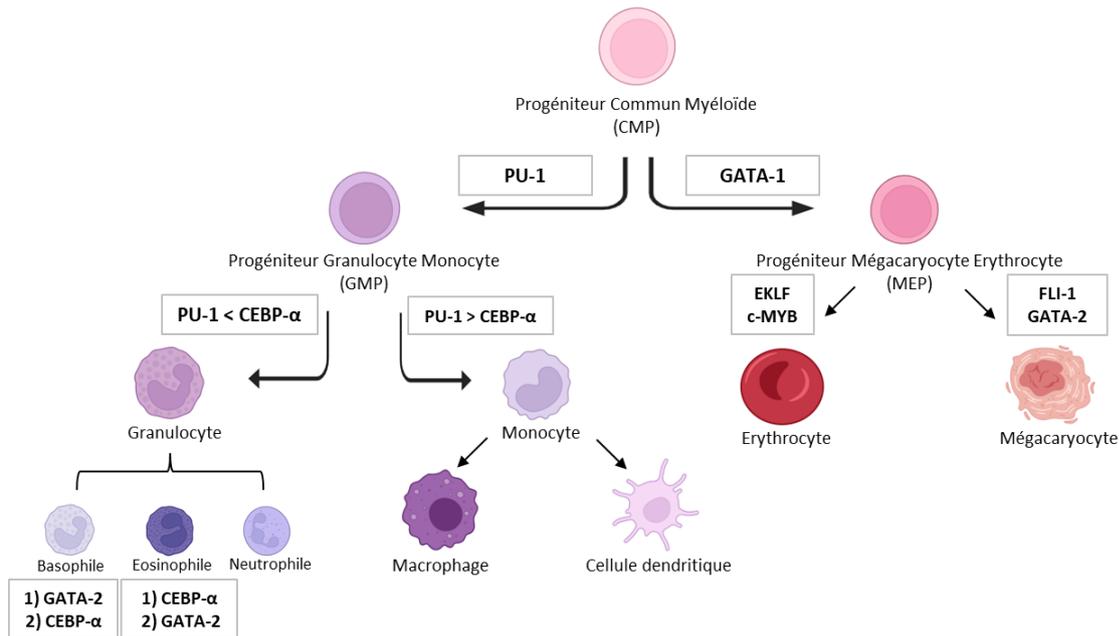
Il a également été montré que PU-1 régule l'expression des récepteurs du GM-CSF, M-CSF et du G-CSF sur les cellules myéloïdes^{65,66}. Le facteur PU-1 se fixe au niveau du promoteur du récepteur M-CSF afin de réguler positivement l'expression du récepteur dans les macrophages et au contraire inhiber son expression dans les autres cellules⁶⁷. PU-1 régule également l'expression de CD11b (ou ITGAM Intégrin alpha M), un marqueur membranaire exprimé par les cellules myéloïdes⁶⁸.

Un autre facteur de transcription est impliqué dans la régulation de l'hématopoïèse, il s'agit de GATA-2. Ce dernier est impliqué également dans la régulation des granulocytes avec le facteur C/EBP α . Si C/EBP α est exprimé en premier puis suivi de l'expression de GATA-2 alors on obtient des granulocytes éosinophiles. Si l'expression est inversée avec en premier une expression forte de GATA-2 alors on obtient des granulocytes basophiles. L'expression des facteurs de transcription peut également être séquentielle, ce qui oriente la différenciation des cellules⁶³.

4) Différenciation des MEP : érythrocytes ou mégacaryocytes ?

Les MEP se divisent en deux sous-populations de cellules matures ; les érythrocytes ou les mégacaryocytes. Ces deux populations expriment chacune le facteur GATA-1. L'engagement dans la voie mégacaryocytaire est marqué par l'expression de GATA-2⁶⁹. Ce dernier inhibe la différenciation érythrocytaire et contrôle l'expression de gènes impliqués dans la différenciation des mégacaryocytes. Un autre facteur de transcription, c-MYB, est impliqué dans l'engagement des cellules vers la différenciation érythrocytaire^{70,71}. Il a également été montré l'antagonisme entre deux autres facteurs de transcription EKL/FLI1 dans les MEP, ce qui oriente la différenciation des cellules en érythrocytes (EKL) ou en mégacaryocytes (FLI-1)⁷².

Figure 4 : Régulation de la différenciation myéloïde par des facteurs de transcription essentiels



VIII- Régulation post-transcriptionnelle et traductionnelle de l'expression génique

Outre la régulation par des facteurs de transcription ¹³, il existe une régulation post transcriptionnelle, traductionnelle et de modification de protéines. La quantité de facteurs de transcription actifs dépend des variations traductionnelles et de modification de protéines. C/EBP-α présente deux isoformes protéiques, en raison de codons d'initiation de la traduction (AUG) alternatifs donnant une forme longue (42 kDa) et une forme tronquée en N-terminal (30 kDa) ⁷³. La forme courte perd un domaine de transactivation et présente une liaison diminuée à l'ADN alors que la forme longue de la protéine est transcriptionnellement active avec une forte affinité de liaison pour l'ADN. La régulation de l'initiation de la traduction est une étape clé modulée par les facteurs eIF2a/eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 2a/ eukaryotic translation initiation factor 4E) et contrôlant l'équilibre entre les 2 formes. Ainsi, la fonction d'un facteur de transcription peut dépendre de l'endroit où démarre la traduction de son ARNm.

La traduction est l'étape finale de l'expression des gènes et permet de contrôler le niveau d'expression des protéines. En effet la concentration de certains facteurs en quantité plus ou moins importante dicte le destin des cellules. Certaines mutations décrites dans la LAM

suractivent des voies de signalisation qui peuvent être impliquées dans la régulation du complexe d'initiation de la traduction. Nous détaillerons les mécanismes de la traduction dans une autre partie.

En résumé :

L'hématopoïèse est un processus finement régulé impliquant la coopération de nombreux acteurs. La moindre dérégulation peut conduire à un déséquilibre de la niche, des CSH et de la production des cellules sanguines matures. La régulation de l'hématopoïèse permet de produire toutes les cellules du système sanguin tout en régulant et maintenant un pool de CSH. Cette balance est importante pour le maintien de l'homéostasie hématopoïétique.

L'hématopoïèse nécessite une régulation fine du micro-environnement de la niche et de l'expression des gènes à chaque étape du développement. Le maintien de l'homéostasie cellulaire est essentiel pour prévenir le développement de nombreuses maladies. L'expression génique est le résultat de nombreuses étapes passant de la transcription à la traduction des ARNm en protéines. Une dérégulation d'un des maillons de l'hématopoïèse peut induire une perturbation de la différenciation de certains types de cellules et ainsi engendrer différentes maladies allant d'une simple anémie au développement d'hémopathies malignes telles que les leucémies⁷⁴. Dans ce travail nous allons décrire plus particulièrement les leucémies aiguës myéloïdes.

Partie II : Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM)

I- Définition :

Les leucémies sont des hémopathies malignes caractérisées par une dérégulation de l'hématopoïèse. Les altérations (translocations chromosomiques et/ou mutations) conduisent à un blocage de la différenciation cellulaire, une prolifération clonale accrue et une accumulation de blastes dans la moelle osseuse et le sang. Il en résulte une absence de cellules matures et fonctionnelles permettant l'équilibre du tissu hématopoïétique ⁷⁴.

Les leucémies se définissent en fonction de l'origine du précurseur atteint. On distingue alors les leucémies myéloïdes et les leucémies lymphoïdes. Pour chacune de ces leucémies, il existe une forme chronique et une forme aiguë. La leucémie chronique est une forme à évolution lente et touche des cellules à des stades de différenciation tardifs créant une accumulation de cellules matures anormales. En revanche les leucémies aiguës sont d'évolution rapide, les cellules sont bloquées à des stades précoces de maturation.

Nous parlerons ici des leucémies aiguës myéloïdes ou LAM. Cette hémopathie se caractérise par un blocage de la différenciation cellulaire au niveau des progéniteurs myéloïdes et une multiplication incontrôlée des blastes myéloïdes qui vont envahir la moelle et le sang ⁷⁵. La transformation des cellules hématopoïétiques en cellules leucémiques va altérer la production de cellules sanguines normales. Le blocage de la différenciation des progéniteurs myéloïdes va se faire à des stades différents au cours de l'hématopoïèse caractérisant les différents sous-types de LAM.

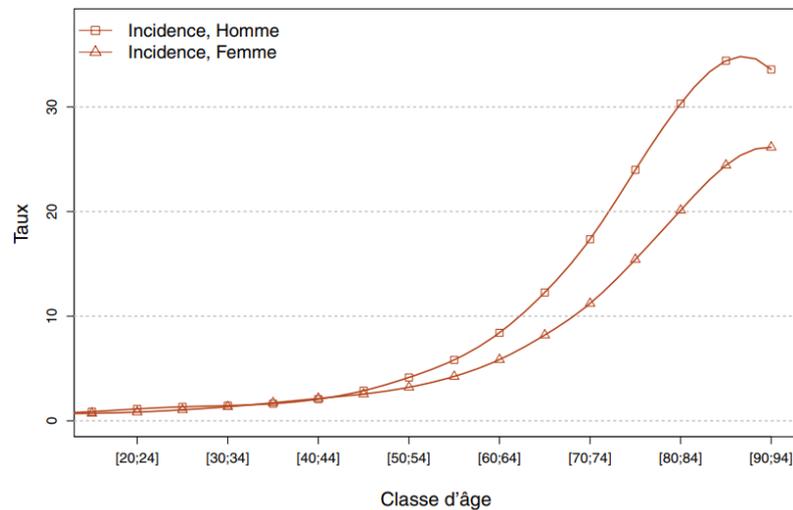
II- Epidémiologie :

La LAM est le cancer du sang le plus courant de l'adulte mais cette hémopathie est définie comme une maladie rare. En effet selon Santé Publique France et l'institut national du cancer, le nombre de nouveaux cas en 2018 en France est estimé à 3428. Le taux d'incidence des LAM sur la population mondiale représente 3.1/100 000 personnes chez l'homme et de 2.1/100 000 chez la femme, et représente 1% des cancers.

L'âge médian de survenue des LAM est de 69 ans chez l'homme et de 72 ans chez la femme ⁷⁶. Ce sont des hémopathies rares chez l'adulte de moins de 40 ans et chez les enfants mais elles surviennent en général avant 2 ans ou après 15 ans. Le taux de LAM est plus élevé dans

les pays développés, la France se situe à la 17^{ème} position ⁷⁷. Les LAM dans leur ensemble sont de pronostic défavorable, avec une survie à 1 an estimée à 50% et à 27% à 5 ans ⁷⁸ (Figure 5).

Figure 5 : Taux d'incidence selon la classe d'âge en France en 2018



III- Facteurs de risques :

Dans la majorité des cas, les LAM se développent sans cause ou facteurs connus comme étant impliqués dans le développement de cette pathologie. Cependant certains facteurs de risques ont tout de même été mis en évidence.

Des facteurs environnementaux comme une exposition à des rayonnements ionisants, à des produits chimiques comme le benzène, les solvants industriels ou les hydrocarbures peuvent être impliqués dans le développement des LAM ⁷⁹.

Certaines anomalies génétiques favorisent le développement des LAM comme la trisomie 21, la maladie de Fanconi, ou encore la neurofibromatose de type I (maladie de Recklinghausen).

Les LAM peuvent se développer suite à des maladies hématologiques préexistantes telles que des syndromes myélodysplasiques (trouble de l'hématopoïèse conduisant à des cytopénies sanguines) ⁸⁰ et des néoplasies myéloprolifératives (production en excès de cellules sanguines).

Cette hémopathie peut également se développer chez des personnes ayant eu recours à un traitement par chimiothérapie (agents alkylants, inhibiteurs de topoisomérase II) et/ ou par radiothérapie pour traiter une pathologie antérieure. On parlera alors de LAM secondaires lorsqu'elles font suite à une autre pathologie ^{81,82}.

IV- Symptômes et diagnostic

Il n'existe pas de signes cliniques spécifiques des LAM, elles se développent rapidement, et peuvent parfois rester silencieuses. Certains symptômes peuvent cependant alerter tels que des saignements, une altération de l'état général, une pâleur, des hématomes, de nombreuses infections ou bien encore des douleurs osseuses.

D'autres signes moins fréquents peuvent apparaître comme une augmentation des ganglions, et plus rarement un amas de cellules cancéreuses appelé sarcome granulocytaire qui peut être confondu avec une tumeur solide.

Afin d'identifier la pathologie, une numération de la formule sanguine (NFS) est alors réalisée par prise de sang. La mise en évidence d'une cytopénie peut être révélatrice d'une leucémie. Une cytopénie se caractérise par une diminution de globules rouges (anémie), du taux de plaquette (thrombopénie) et/ou du nombre de globules blancs matures (leucopénie) dans le sang.

Un myélogramme est l'examen clé permettant de poser un diagnostic de LAM. Il consiste à analyser la morphologie des cellules de la moelle osseuse. Le prélèvement s'effectue par ponction au niveau du sternum ou de l'épine iliaque. Le diagnostic est confirmé si l'analyse de la moelle montre plus de 20% de cellules immatures (blastes). La ponction de la moelle osseuse permettra également une analyse plus approfondie. Une caractérisation immunophénotypique (marqueurs de surface), moléculaire (mise en évidence de mutations) et cytogénétique (analyse du caryotype) permettra de définir le sous-type de LAM et un diagnostic précis de la maladie.

V- Classification des LAM :

La LAM est une hémopathie très hétérogène, cependant le blocage des blastes à différents stades de maturation permet une caractérisation des cellules leucémiques et de proposer une classification des LAM. La première classification qui a été proposée est la Classification FAB

(Franco-Américain Britannique) en 1976 ⁸³, puis révisée en 1985 ⁸⁴. Cette classification est basée sur la morphologie des blastes et permet de déterminer le sous-type de LAM. Elle subdivise les LAM en 8 sous-types.

Grâce à différentes approches de coloration (MGG, Soudan Noir etc.), il est possible de caractériser les cellules et de différencier les blastes des cellules normales. En effet les blastes présentent notamment des granulations cytoplasmiques prenant un aspect de bâtonnets (corps d'Auer). La présence de myéloperoxydase (MPO) par coloration cytochimique met aussi en évidence la nature myéloïde de la leucémie (taux de blaste MPO-positif supérieur à 3%). Ces analyses morphologiques permettent de définir le sous-type de LAM.

Le premier sous-type M0 est caractérisé par un blocage précoce de la différenciation, avec la présence de blastes myéloblastiques indifférenciés. La leucémie myéloblastique sans maturation de sous-type M1 présente une prédominance de myéloblastes avec moins de 10% de différenciation granulocytaire et monocyttaire. Le sous-type M2 ou leucémie myéloblastique avec maturation se caractérise par plus de 30% de myéloblastes, au moins 10% de différenciation granulocytaire et moins de 20% de différenciation monocyttaire.

Le sous-type M3 ou leucémie aiguë promyélocytaire (LAP) est une entité particulière caractérisée par la translocation $t(15;17)(q22;q12)$. Cette dernière est à l'origine de la protéine de fusion PML-RAR α . Ce sous-type particulier se définit par la présence de promyélocytes anormaux avec de nombreuses granulations.

Le sous-type M4 ou leucémie myélomonocytaire présente entre 30% et 80% de myéloblastes, et au moins 20% de cellules différenciées en monocytes. La leucémie monocyttaire de sous-type M5 se caractérise par au moins 80% de monoblastes, de pro-monocytes ou de monocytes. La deuxième classification a permis de distinguer deux sous-types M5. Le sous-type M5a se définit par la présence d'au moins 80% de monoblastes alors que dans le sous-type M5b, moins de 80% des cellules monocytaires sont des monoblastes.

La leucémie érythrocytaire ou M6 possède plus de 50% d'érythroblastes et plus de 30% de myéloblastes. Le dernier sous-type M7 ou leucémie mégacaryocytaire se caractérise par la présence de blastes bloqués empêchant la différenciation des cellules en mégacaryocytes ⁸⁵.

La classification FAB (Figure 6) permet de caractériser les LAM uniquement par une étude morphologique mais ne prend pas en compte la présence d'anomalies génétiques (mutation,

translocation chromosomique...). Il est donc essentiel de ne pas seulement utiliser cette classification pour caractériser la LAM.

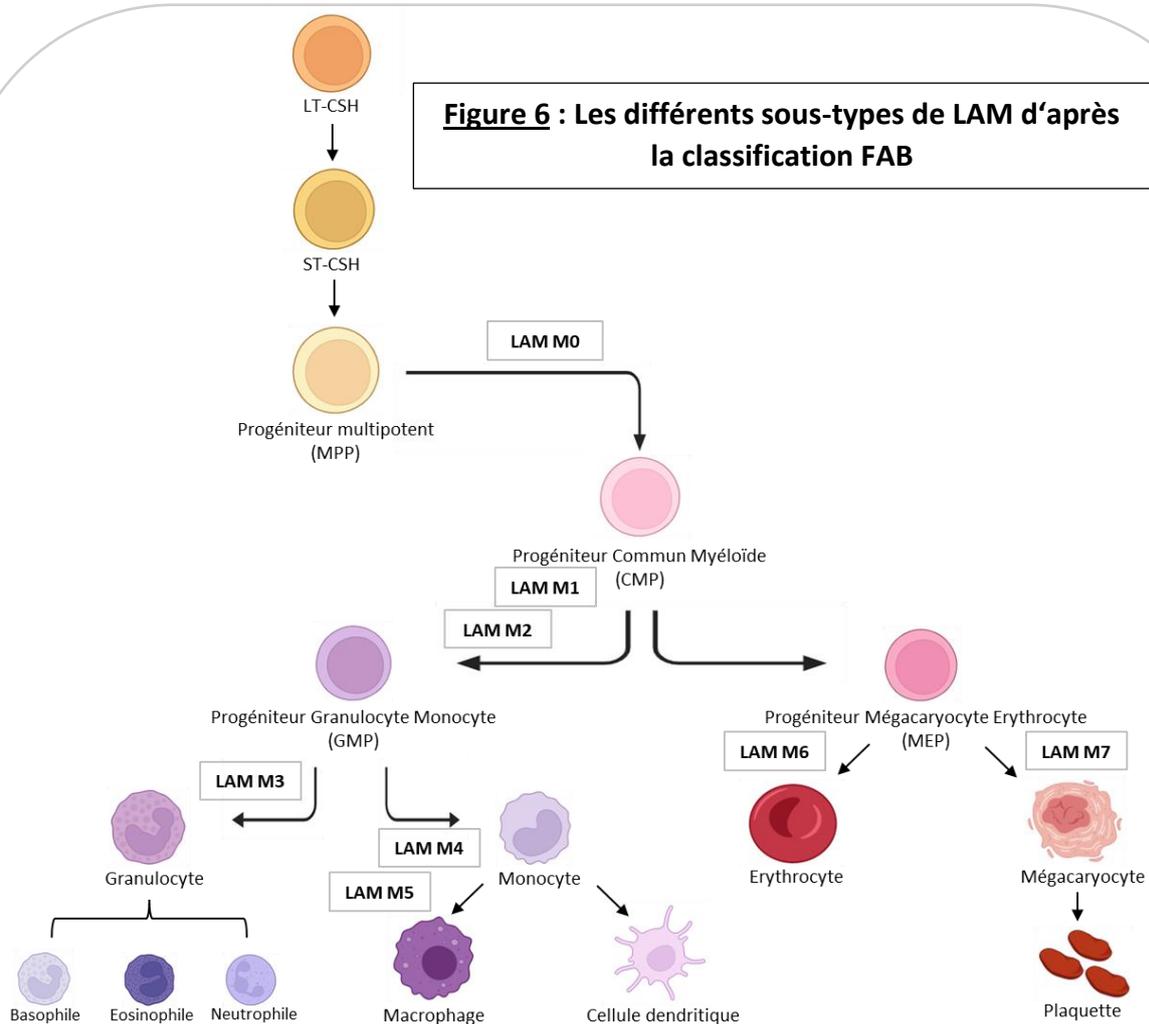


Figure 6 : Les différents sous-types de LAM d'après la classification FAB

Sous-type de LAM	Caractéristiques
M0	Blocage le plus précoce : blastes indifférenciés
M1	Leucémie myéloblastique sans maturation
M2	Leucémie myéloblastique avec maturation
M3	Leucémie aiguë promyélocytaire (LAP)
M4	Leucémie myélomonocytaire
M5	Leucémie monocytaire
M6	Erythroleucémie
M7	Leucémie mégacaryocytaire

L'European LeukemiaNet (ELN) ⁸⁶⁻⁸⁸ publie un rapport permettant de caractériser les LAM en fonction des différentes anomalies génétiques (mutations, aberrations chromosomiques). Ces recommandations de l'ELN sont utilisées pour le diagnostic et la prise en charge des patients atteints de LAM. Afin de toujours mieux caractériser et soigner cette hémopathie, les rapports sont actualisés régulièrement en fonction des différentes découvertes et avancées thérapeutiques.

L'ELN présente dans son rapport 2022 les principaux marqueurs de surface (Figure 7) utilisés pour classifier et caractériser les LAM ⁸⁸.

Figure 7 : Principaux marqueurs de surface utilisés pour la caractérisation des sous-types de LAM d'après l'ELN 2022

Marqueurs de surface	
Précurseurs	CD34, CD117, HLA-DR
Cellules myéloïdes	CD33, CD13
Cellules myéloïdes (mature)	CD11B, CD15, CD64, CD65
Monocytes	CD14, CD36, CD64, CD4, CD38, CD11c
Mégacaryocytes	CD41 (glycoprotéine IIb), CD61 (glycoprotéine IIIa), CD36
Erythrocytes	CD235a, CD71, CD36

Les populations de cellules sont isolables grâce à l'identification de marqueurs cellulaires caractéristiques de chaque population. Au cours du temps et grâce aux différentes technologies, différents marqueurs de surface permettant de distinguer chaque sous-type cellulaire ont été mis en évidence. Nous décrivons ici seulement les marqueurs les plus communs. Ces marqueurs sont utiles pour le diagnostic des leucémies et définir quel progéniteur est atteint.

Quelques mots sur les principaux marqueurs de surface des LAM ⁸⁹:

- Le marqueur CD34 (cluster of differentiation 34) est le marqueur par excellence de caractéristiques des CSH.
- Le marqueur CD38 (cluster of differentiation 38) est absent des progéniteurs les plus immatures mais il sera exprimé au cours de la maturation des progéniteurs.
- Les progéniteurs n'expriment aucun antigène de différenciation (Lin-).

- CD11b et CD14 (cluster of differentiation 14) sont deux marqueurs membranaires permettant d'identifier les cellules monocytaires.

L'ELN propose également une classification en fonction du pronostic des patients afin d'améliorer la prise en charge thérapeutique des LAM (Figure 8). En se basant sur les anomalies génétiques, le patient sera classé en 3 catégories de risques différentes : favorable, intermédiaire ou défavorable.

Figure 8 : Classification des LAM selon les recommandations de l'ELN 2022 d'après les anomalies génétiques en différents groupes de pronostics

Classification	Anomalies génétiques
Favorable 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ t(8;21)(q22;q22.1) ; RUNX1 - RUNX1T1 ▪ inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22) ; CBFβ - MYH11 ▪ NPM1 muté sans FLT3 -ITD ▪ bZIP muté CEBPA (mono ou biallélique)
Intermédiaire 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ NPM1 muté avec FLT3 -ITD ▪ NPM1 de type sauvage avec FLT3 -ITD (sans lésions génétiques à risque indésirable) ▪ t(9;11)(p21.3;q23.3) ; MLLT3 - KMT2A ▪ Anomalies cytogénétiques et/ou moléculaires non classées comme favorables ou indésirables
Défavorable 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ t(6;9)(p23.3;q34.1) ; DEK - NUP214 ▪ t(v;11q23.3) ; KMT2A - réarrangé ▪ t(9;22)(q34.1;q11.2) ; BCR - ABL1 ▪ t(8;16)(p11.2;p13.3) ; KAT6A - CREBBP ▪ inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3 ;q26.2) ; GATA2 , MECOM (EVI1) ▪ t(3q26.2;v) ; MECOM (EVI1) - réarrangé ▪ -5 ou del(5q); -7 ; -17/abn(17p) ▪ Caryotype complexe ou caryotype monosomal ▪ Muté ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1 ou ZRSR2 ▪ TP53 muté

Une autre classification mondiale est mise à disposition afin d'établir un diagnostic des différentes hémopathies. La classification de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) réunit toutes les informations disponibles afin de caractériser, diagnostiquer et traiter au mieux les hémopathies malignes⁹⁰⁻⁹³. Cette classification tient compte de critères morphologiques (cytologie et histologie), immunophénotypiques, moléculaires et cytogénétiques ainsi que des

recommandations cliniques. L'OMS reprend également dans son rapport la classification FAB. La classification des LAM se fera d'après les anomalies génétiques identifiées (Figure 9).

Figure 9 : Classification des LAM selon les recommandations de l'OMS 2022

Classification	Caractéristiques
Avec anomalies génétiques	
LAM avec anomalies génétiques récurrentes	<ul style="list-style-type: none"> ▪ t(8;21)(q22;q22.1) ; RUNX1 - RUNX1T1 ▪ inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22) ; CBFβ - MYH11 ▪ Fusion PML-RARA ▪ KMT2A : réarrangement avec 80 partenaires de fusion ▪ NUP98 : réarrangement ▪ MECOM : réarrangement ▪ (6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 ▪ t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MRTFA</i> (anciennement RBM15-MKL1) ▪ t(9;22)(q34.1;q11.2) ; BCR - ABL1 ▪ RUNX1 muté ▪ NPM1 muté ▪ CEBPA muté (biallélique ou mutation unique dans le domaine bZIP)
LAM liée à la myélodysplasie	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Anomalies cytogénétiques et/ou moléculaires (mutations basées sur l'ensemble de 8 gènes : SRSF2, SF3B1, U2AF1, ZRSR2, ASXL1, EZH2, BCOR, STAG2) associées à la myélodysplasie.
LAM avec d'autres altérations génétiques définies	<ul style="list-style-type: none"> ▪ AML avec des fusions génétiques rares
Sans anomalies génétiques	
LAM sans définition des anomalies génétiques, caractérisation basée sur la différenciation	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Leucémie myéloïde aiguë à différenciation minimale ▪ Leucémie myéloïde aiguë sans maturation ▪ Leucémie myéloïde aiguë avec maturation ▪ Leucémie aiguë basophile ▪ Leucémie myélomonocytaire aiguë ▪ Leucémie monocytaire aiguë ▪ Leucémie érythroïde aiguë ▪ Leucémie aiguë mégacaryoblastique
Sarcome myéloïde	
Sarcome myéloïde	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Manifestation tissulaire (tumeur solide rare)

Quelques précisions concernant la classification de l'OMS 2022 :

- La caractérisation d'une LAM peut se faire même si le nombre de blastes est inférieur à 20% en fonction de la mutation et des signes cliniques du patient. Par exemple avec un réarrangement impliquant KMT2A, MECOM et NUP98, le diagnostic d'une LAM

peut être fait même si le nombre de blastes est inférieur à 20% et que les caractéristiques cliniques sont semblables à ceux d'un patient présentant un nombre de blastes plus élevés.

- Le terme « AML avec réarrangement KMT2A » remplace la terminologie t(9;11)(p22;q23) ; KMT2A-MLLT3 dans la classification. En effet il a été décrit 80 partenaires de fusion possibles de KMT2A. Les partenaires MLLT3, AFDN, ELL et MLLT10 sont les plus courants. Cependant définir le partenaire de fusion n'est pas obligatoire mais souhaitable pour définir le pronostic et la surveillance des patients atteints de LAM. De plus chez les enfants en particulier, le réarrangement de KMT2A avec MLLT3 ou MLLT10 présente une différenciation mégacaryoblastique.
- La mutation CEBPA est décrite comme ayant un pronostic favorable chez les enfants et adultes jusqu'à 70 ans.
- La LAM avec la mutation somatique RUNX1 n'est plus reconnue comme un sous-type de maladie distinct dans la nouvelle classification.
- La LAM érythroïde aiguë se caractérise par un arrêt de différenciation des cellules érythroïdes et présente une prévalence élevée d'altération biallélique de TP53.
- Le syndrome de Down peut être associé au développement des leucémies mégacaryoblastiques aiguës.
- Le sarcome myéloïde est une tumeur maligne rare qui se définit comme une tumeur extra-médullaire composée de blastes myéloïdes⁹⁴.

Ces classifications se complètent et sont devenues essentielles pour caractériser et classer les LAM. Cela permet de définir des recommandations « universelles » pour chaque sous-type de leucémies afin de définir la meilleure stratégie thérapeutique.

VI- Les altérations génétiques

Comme pour les cancers, l'accumulation d'altérations génétiques est à l'origine du développement de différentes pathologies malignes. L'acquisition progressive d'aberrations génétiques reprogramme et transforme le système hématopoïétique sain et est responsable du développement des LAM. Les leucémies se développent à partir de l'acquisition en série de mutations dans les cellules souches et les progéniteurs hématopoïétiques⁹⁵. Ces mutations vont conduire à une dérégulation de l'hématopoïèse et à la propagation de clones

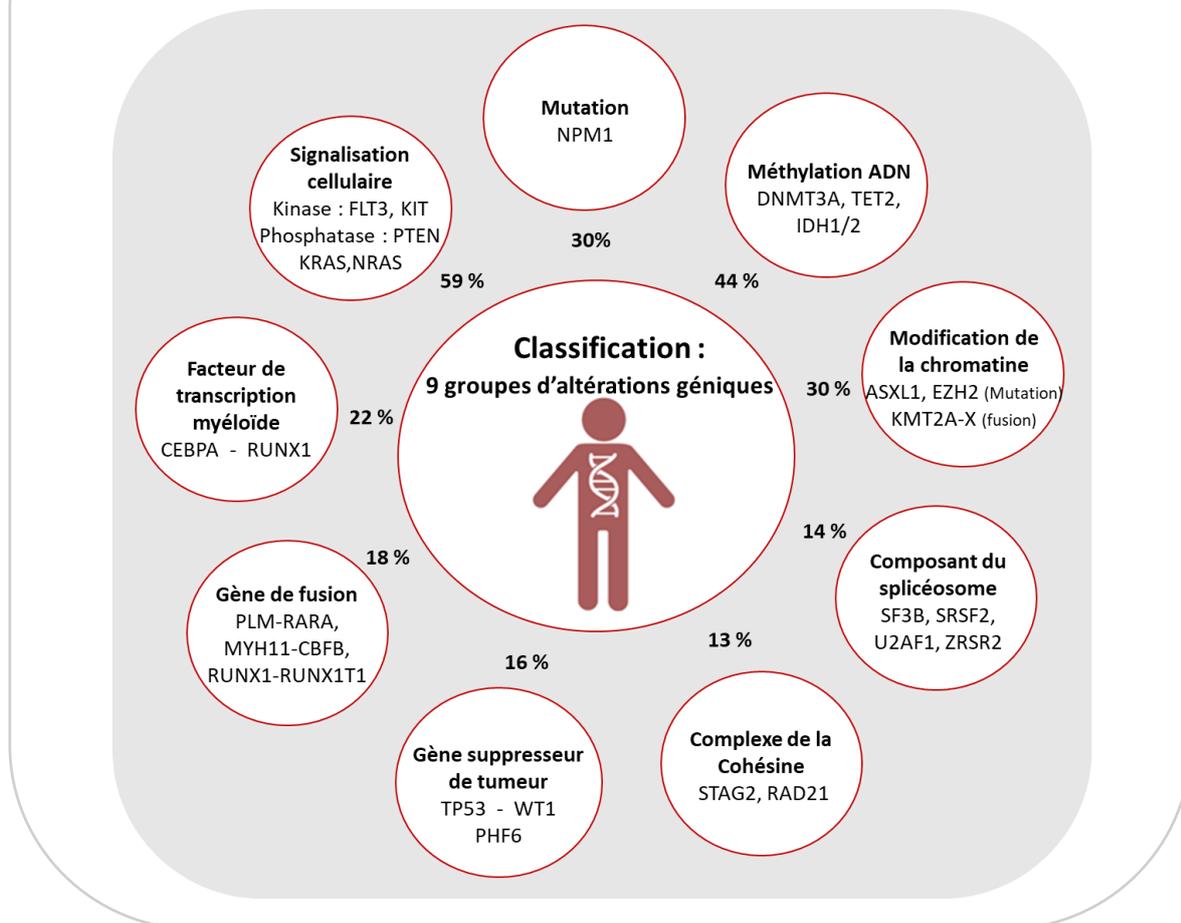
leucémiques appelés blastes tumoraux, aux propriétés de prolifération et différenciation anormales ^{96,97,98}.

Bien que l'acquisition de plusieurs mutations soit responsable du développement de cancers, il a été mis en évidence que les LAM présentent un nombre de mutations plus faible que la plupart des autres cancers ^{99,100}. Il est montré une moyenne d'environ 13 gènes mutés dont 5 de manières récurrentes chez les patients atteints de LAM. Une étude réalisée à partir des cohortes du TCGA (The Cancer Genome Atlas) a permis de classer les anomalies génétiques en 9 groupes ⁹⁶ partageant des fonctions biologiques similaires dans la pathogenèse de la LAM.

Classification des mutations et réarrangements chromosomiques (Figure 10) :

- Le gène codant pour la nucléophosmine (NPM1) : 30%
- Les gènes des voies de signalisation : 59%
- Les mutations de gènes de facteurs de transcription myéloïde : 30%
- La fusion de facteurs de transcription : 18%
- Les gènes suppresseurs de tumeurs : 16%
- Les gènes liés à la méthylation de l'ADN : 44%
- Des mutations de gènes modifiant la chromatine : 30%
- Les gènes du complexe de la cohésine : 13%
- Les gènes du complexe du spliceosome : 14%

Figure 10 : Classification des altérations génétiques en 9 groupes d'après les cohortes du TCGA



Les aberrations génétiques de chaque groupe partagent des fonctions biologiques communes. Les mutations ou réarrangements de gènes sont à l'origine de la dérégulation de l'expression génique et par conséquent leurs fonctions biologiques en sont altérées ¹⁰¹. Les aberrations génétiques peuvent être mutuellement exclusives, survenir simultanément ou bien de façon progressive chez les patients atteints de LAM ⁸⁷. Par exemple les mutations DNMT3A, NPM1, C/EPB- α , IDH1/2 et RUNX1 s'excluent des fusions de gènes de facteurs de transcription. Certaines altérations génétiques peuvent être initiatrices et induire une accumulation progressive d'aberrations conduisant au développement des cancers ¹⁰². Le développement de LAM peut être dû à des anomalies chromosomiques à l'origine d'un caryotype anormal, où seulement à des mutations et on parlera de LAM à caryotype normal. Certaines mutations comme DNMT3A, TET2, ASXL1, IDH1/2 semblent être des mutations précoces de la leucémogénèse alors que d'autres mutations comme FLT3 ou NRAS apparaissent plus tardivement et sont généralement des événements secondaires ⁹⁸.

La mutation de la protéine nucléolaire nucléophosmine 1 (**NPM1**), touche d'environ 30% des patients et est la plus fréquente mutation des LAM. Il s'agit d'un évènement tardif dans la leucémogénèse. Elle peut également être associée avec d'autres mutations ⁹⁸. La mutation NPM1 est associée à un bon pronostic avec une survie à 5 ans favorable ¹⁰³ mais qui peut varier selon avec quelle autre mutation elle est exprimée comme par exemple avec la mutation FLT3-ITD où le pronostic et la réponse au traitement diminuent ¹⁰⁴ (Figure 11).

Figure 11 : La mutation NPM1 associée avec d'autres altérations génétiques dans la LAM

Altération Génétique	Association avec d'autres anomalies
NPM1 (30%)	DNMT3A : 50% FLT3-IDH : 40% Gène de la cohésine (RAD21, SMC1A, SMC3) : 20% NRAS : 20% IDH1 : 20% - IDH2 ^{R140} : 15% PTPN11 : 15% TET2 : 15%

La mutation NPM1 s'exclue mutuellement avec les mutations RUNX1, C/EBP- α et TP53. La mutation FLT3-TKD (mutation dans le domaine tyrosine kinase) ne semble ne pas non plus être associée avec la mutation NPM1 ainsi qu'avec les réarrangements chromosomiques comme PLM-RAR α ou MYH11-CBFB. La protéine NPM1 est impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires comme la réparation de l'ADN, la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose ainsi que la biogénèse des ribosomes ¹⁰¹. Les signaux d'import et d'export nucléaire en font une protéine navette entre le noyau et le cytoplasme. La mutation hétérozygote de NPM1 entraîne la perte d'un signal de localisation nucléaire et crée à la place un signal d'exportation, ce qui entraîne une localisation aberrante de la protéine dans le cytoplasme de la cellule ¹⁰⁵ perturbant ainsi les fonctions biologiques de NPM1.

Les mutations dans les gènes régulant les voies de signalisation ont une forte incidence (59%). Ces mutations activatrices des voies de signalisation confèrent un avantage prolifératif aux cellules et par conséquent une prolifération des cellules leucémiques ainsi qu'une résistance à l'apoptose ¹⁰¹ (Figure 12).

Figure 12 : La mutation FLT3 associée avec d'autres altérations génétiques dans la LAM

Altération Génétique	Association avec d'autres anomalies
FLT3 ITD (20%)	NPM1 (40%) t(15;17) : PLM-RARA (35%) t(6;9) : DEK-NUP214 (70%)
FLT3 TKD (8%)	Inv(16)/t(16;16) : CBFC-MYH11 (20%) t(15;17) : PLM-RARA (15%) NPM1 (15%)

La mutation **FLT3** (fms-like tyrosine kinase 3) fait partie des mutations les plus fréquentes dans les LAM. FLT3 est un récepteur à tyrosine kinase agissant comme récepteur de cytokine pour le ligand FLT3. On distingue les duplications internes en tandem de FLT3 (FLT3-ITD ; 20%) et la mutation dans la boucle d'activation du domaine tyrosine kinase de FLT3 (FLT3-TKD ; 5 à 10 %). Le pronostic des patients dépend de la présence ou non d'autres mutations ainsi que de l'âge des patients ¹⁰⁶. La mutation FLT3 est fréquemment associée avec la mutation NPM1. Une étude a montré que la mutation NPM1 précède la mutation FLT3 dans les LAM ¹⁰⁴ dans la plupart des cas. Ce récepteur FLT3 lorsqu'il est activé va réguler de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la différenciation des cellules et régule aussi l'hématopoïèse normale. La mutation de FLT3 provoque une dimérisation et une phosphorylation constitutive du domaine tyrosine kinase. Cela va conduire à une activation exacerbée des voies de signalisation comme les MAPK (Mitogen-activated protein kinases), RAS/RAF ou encore JAK/STAT (STAT5 : signal transducer and activator of transcription 5) ¹⁰⁷ favorisant par exemple la prolifération cellulaire. Ces voies sont impliquées dans les cascades de signalisation de l'interleukine 3 ¹⁰⁸ ou du GM-CSF par exemple.

Les mutations dans les gènes **NRAS** ou **KIT** engendrent une dérégulation des voies de signalisation à l'origine d'une survie et prolifération cellulaire exacerbée (Figure 13). Les protéines de la famille RAS sont des GTPase activées par les récepteurs membranaires aux facteurs de croissances et agissent sur plusieurs voies de signalisation. La signalisation hyperactive des voies PI3K-Akt ou RAF/MEK/ERK est au cœur de la transformation maligne ¹⁰⁹. Le gène KIT (CD117) code pour un récepteur à activité tyrosine kinase exprimé à la surface des cellules et qui se lie au facteur des cellules souches (FCS). Il est impliqué dans la régulation des voies de signalisation PI3K/Akt, JAK/STAT ou encore des MAPK. Les mutations NRAS ou KIT peuvent être associées avec d'autres anomalies génétiques influençant le diagnostic et la prise en charge thérapeutique des patients.

Figure 13 : Les mutations NRAS et KIT associées avec d'autres altérations génétiques dans la LAM

Altération Génétique	Association avec d'autres anomalies
NRAS (15%)	NPM1 (20%) CEBP- α (biallélique; 30%) Inv(16)/t(16;16) : CBFC-MYH11 t(v;11q23,3) – X-KMT2A
KIT (<5%)	t(8;21) : RUNX1-RUNX1T1 (mauvais pronostic) Inv(16)/t(16;16) : CBFC-MYH11

Les facteurs de transcription contrôlent l'expression génique et régulent notamment l'hématopoïèse. Les réarrangements chromosomiques ou les mutations au niveau des gènes de facteurs de transcription sont impliqués dans la dérégulation de l'homéostasie cellulaire et vont par conséquent induire des blocages de la différenciation des cellules hématopoïétiques. Il existe de nombreuses aberrations génétiques impliquant les facteurs de transcription et responsables du développement de cancers (Figure 14).

Figure 14 : Les mutations CEBP- α et RUNX1 associées avec d'autres altérations génétiques dans la LAM

Altération Génétique	Association avec d'autres anomalies
CEBP- α (1 à 5%) (biallélique)	GATA2 (30%) NRAS (30%) WT1 (20%) CSF3R (20%)
RUNX1 (5 à 20%)	SRSF2 (25%) ASXL1 (20%) KMT2A (15%) IDH2 (12%)

C/EBP- α (CCAAT/enhancer-binding protein- α) est un facteur de transcription crucial pour le développement et la maturation des progéniteurs myéloïdes (Figure 14). Une mutation au niveau de l'extrémité N-terminal et/ou C-terminale modifie la protéine et diminue son interaction avec l'ADN ^{110,111}. Les mutations N-terminales ont pour conséquence la formation de protéines tronquées de 30KDa. La présence de cette forme tronquée chez les patients

atteints de LAM est retrouvée en quantité bien plus importante que la normale. La forme courte par la perte de son domaine transactivateur et d'affinité pour l'ADN va agir comme un régulateur dominant négatif de la forme longue de la protéine ¹¹². La forme courte est impliquée dans la croissance cellulaire, la présence exacerbée de cette forme va accroître la prolifération des cellules tumorales alors que la forme longue régule le cycle cellulaire et favorise la différenciation des cellules myéloïdes ¹¹³. Par son contrôle négatif de la prolifération cellulaire via la répression de gènes comme E2F, la forme longue joue le rôle de suppresseur de tumeurs. Les mutations dans le domaine C-terminal (domaine de fermeture à glissière leucine) vont impacter les fonctions des 2 isoformes de CEBP- α et notamment de la forme longue. Ces mutations ont pour conséquences une prolifération cellulaire exacerbée et un blocage de la différenciation des cellules.

Le facteur de transcription **RUNX1** (Runt-related transcription factor 1) joue un rôle majeur dans l'hématopoïèse et peut être affecté dans la LAM par des mutations mais également par un réarrangement chromosomique (Figure 14). Les mutations sont associées à un mauvais pronostic alors que la fusion des gènes impliquant RUNX1 présente un pronostic favorable. Ce facteur agit comme activateur ou répresseur de l'expression de nombreux gènes hématopoïétiques essentiels comme les facteurs de croissance (GM-CSF, IL-3) ou encore des récepteurs de surface (récepteur M-CSF), des molécules de la signalisation et des activateurs de transcription (STAT3) ¹¹⁴.

Les gènes de fusion proviennent des réarrangements chromosomiques de deux gènes et notamment de facteurs de transcription impliqués dans la régulation et le contrôle de l'hématopoïèse. Lorsque l'on retrouve plus de trois anomalies chromosomiques on parlera de LAM à caryotype complexe conférant une survie médiocre pour le patient. On retrouve environ 10 à 15% de caryotype complexe chez les patients atteints de LAM et souvent des patients âgés. Nous décrivons ici quelques exemples des principaux réarrangements chromosomiques (RUNX1, RAR α , CBF β ..etc) (Figure 15).

Figure 15 : Les fusions de gènes associées avec d'autres altérations génétiques dans la LAM

Altération Génétique	Association avec d'autres anomalies
PML-RARA (13%) : t(15;17)(q22;q21)	FLT3-ITD (35 %) FLT3-TKD (15 %) WT1 (15 %)
RUNX1 - RUNX1T1 (6%) : t(8;21)(q22;q22.1)	KIT (25%) NRAS (20 %) Gène de la cohésine (20%) : RAD21, SMC1A, SMC3 ASXL2 (20%) ASXL1 (10%) ZBTB7A (20%) EZH2 (5%) KDM6A (5%) MGA (5%) DHX15 (5%)
CBFβ - MYH11 (6%) : inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22)	NRAS 40% KIT 35% FLT3-TKD 20% KRAS 15%

La perturbation des fonctions de RUNX1 peut être également le résultat de translocation chromosomique. Il a été démontré que la translocation t(8 ;21)(q22 ;22) implique le gène RUNX1T1 anciennement nommé ETO. La translocation de RUNX1 avec RUNX1T1 est assez fréquente et présente un pronostic favorable. Le domaine de transactivation de RUNX1 est remplacé par la quasi-totalité du gène RUNX1T1. Ce réarrangement chromosomique fonctionne comme un répresseur transcriptionnel des gènes normalement activés par RUNX1¹¹⁴.

La fusion du gène PLM (Promyelocytic Leukemia) avec le gène codant pour le récepteur α de l'acide rétinoïque (RARα) est la résultante de la translocation chromosomique t(15 ;17)(q24 ;q21) : **PLM-RARα**. Cette altération chromosomique est responsable du développement de la leucémie aiguë promyélocytaire (LAP), sous type M3 de la LAM. Le gène PLM code pour une protéine agissant comme suppresseur de tumeurs et prévient la croissance cellulaire incontrôlée. Le récepteur à l'acide rétinoïque appartient à la famille des récepteurs/facteurs de transcription nucléaire et contrôle l'expression de gènes impliqués dans la différenciation des cellules et plus précisément des granulocytes. La protéine de fusion ne remplit aucune de ces fonctions et est responsable du blocage de la différenciation des cellules en granulocytes et de l'accumulation de blastes¹¹⁵. Cependant cette fusion confère un bon pronostic aux patients atteints de ce sous-type de LAM.

CBFβ (Core Binding Factor subunit beta) est un facteur de transcription régulant des gènes spécifiques de l'hématopoïèse. Il fait partie du complexe transcriptionnel contenant RUNX1 (ou CBFα). Le gène MYH11 code pour la chaîne lourde de la myosine 11 du muscle lisse et participe à l'hydrolyse de l'ATP. Le réarrangement chromosomique inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22) code pour la protéine de fusion CBFβ-MYH11 ¹¹⁶.

Les gènes suppresseurs de tumeurs régulent l'homéostasie cellulaire et empêchent le développement de cancers. Une dérégulation par des mutations inactivatrices par exemple est à l'origine d'une prolifération anarchique et de la progression tumorale. TP53 est un suppresseur de tumeur des plus connus régulant le cycle cellulaire, l'apoptose ou encore la réparation de l'ADN. Des mutations de TP53 (Figure 16) provoquent une inactivation de son rôle de suppresseur de tumeurs provoquant le développement de LAM. Les mutations de TP53 dans les LAM sont plus rares et étroitement liées à un caryotype complexe et plus fréquentes chez les patients âgés avec une survie globale faible ¹¹⁷.

Figure 16 : La mutation TP53 associée avec d'autres altérations génétiques dans la LAM

Altération Génétique	Association avec d'autres anomalies
TP53 (5 à 20%)	Associé avec des fusions de gènes et/ou un caryotype complexe (plus de 3 réarrangements).

La méthylation de l'ADN est un processus épigénétique essentiel contrôlant l'expression des gènes. Les mutations DNMT3A, IDH et TET2 représentent les trois principales mutations de gènes régulant la méthylation de l'ADN (Figure 17). Elles sont impliquées dans le développement des LAM. Ces mutations peuvent également être associées à d'autres anomalies des LAM. Les mutations IDH1 et 2 s'excluent mutuellement ainsi qu'avec la mutation TET2.

Figure 17 : Les mutations DNMT3, IDH et TET2 associée avec d'autres altérations génétiques dans la LAM

Altération Génétique	Association avec d'autres anomalies
DNMT3A (15 à 30%)	NPM1 FLT3-ITD IDH ½
IDH1 (6 à 10%)	NPM1
IDH2 ^{R140} (5 à 15%)	NPM1
IDH2 ^{R172} (1 à 4%)	Mutuellement exclusive avec NPM1
TET2 (5 à 25%)	NPM1 Mutuellement exclusive avec IDH1/2

Le gène **DNMT3A** code pour des ADN méthyltransférases, ce sont des régulateurs épigénétiques impliqués dans la méthylation de l'ADN (Figure 17). Ces enzymes catalysent l'ajout d'un groupe méthyl sur les résidus cytosines au niveau des îlots CpG. Une méthylation accrue au niveau des îlots CpG est souvent associée à une expression réduite du gène situé en aval ¹¹⁸. Les mutations sont à l'origine d'une dérégulation de la méthylation des gènes. Dans les LAM, la mutation du gène de la méthyltransférase 3A la plus fréquente se situe au niveau du domaine C-terminal avec un enrichissement de mutations au niveau de l'arginine 882 (Mutation R882). Cette mutation est à l'origine d'une diminution de l'activité méthyltransférase et par conséquent d'une hypométhylation de certains gènes. De ce fait l'expression de ces gènes peut être exacerbée et favorise ainsi le développement des LAM. De plus le mutant exerce un effet dominant négatif sur la protéine sauvage. Il n'est pas rare d'avoir des mutations qui vont au contraire être à l'origine d'hyperméthylation des promoteurs notamment au niveau des gènes suppresseurs de tumeurs. Les cellules mutées pour ce gène démontrent un potentiel de résistance et de survie à la chimiothérapie. La mutation DNMT3A semble être d'apparition précoce dans les CSH ¹¹⁹. Il semblerait que la mutation NPM1 soit secondaire à la mutation DNMT3 ¹²⁰.

L'isocitrate déshydrogénase 1 (**IDH1**) et 2 (**IDH2**) sont des enzymes du cycle du citrate dépendante du NADP (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate), cofacteurs essentiels dans le maintien de l'homéostasie oxydo-réductive (Figure 17). Ces deux enzymes convertissent l'isocitrate en α -cétoglutarate et possèdent des fonctions métaboliques

similaires mais IDH1 se trouve dans le cytosol alors que IDH2 dans la mitochondrie. L' α -cétoglutarate joue un rôle central dans différentes voies métaboliques comme le cycle de Krebs. Les mutations IDH1 (R132) et IDH2 (R140 et R172) orchestrent une réaction consommatrice de l' α -cétoglutarate et induisent sa transformation en un métabolite oncogène le 2-hydroxyglutarate ¹²¹. L'accumulation de ce dernier engendre une inhibition de TET2 conférant une hyperméthylation des gènes. Il inhibe également des facteurs permettant la déméthylation des histones. Ces mutations favorisent une hyperméthylation globale de plusieurs gènes impliqués dans l'hématopoïèse et désorganisent la différenciation hématopoïétique ¹²².

TET2 (ten-eleven translocation 2) est une méthylcytosine dioxygénase qui catalyse la conversion de la méthylcytosine en 5-hydroxyméthylcytosine (base dérivée de la cytosine qui a subi une méthylation puis une hydroxylation) et joue un rôle d'interrupteur qui permet d'activer ou d'inactiver différents gènes régulant l'hématopoïèse. L'hydroxyméthylation est une étape intermédiaire à la déméthylation de l'ADN. Des mutations de TET2 pourrait donc compromettre le contrôle de l'expression génique et favoriser la leucémogénèse causée par une méthylation accrue de promoteurs ¹²³. Il semblerait que cette mutation soit un évènement précoce dans le développement des LAM.

Les gènes de la **cohésine** contrôlent la séparation des chromatines et participent à la régulation transcriptionnelle de la différenciation cellulaire. Les mutations sont responsables de la perte de fonction de plusieurs facteurs comme STAG2, RAD21, SMC1A ou encore SMC3. Les mutations qui touchent les facteurs du complexe du **spliceosome** sont à l'origine d'une dérégulation de l'épissage des ARN. Enfin les mutations ou fusions de gènes impliqués dans la **modification de la chromatine** engendrent des dérégulations de l'expression des gènes. Par exemple le gène ASXL1 module la chromatine et de ce fait joue son rôle de régulateur transcriptionnel. Le gène KMT2A (lysine N-méthyltransférase 2A) est impliqué dans la méthylation des histones notamment de l'histone 3 lysine 4 (H3K4), processus essentiel qui régule de façon positive ou négative la transcription des gènes. La duplication partielle en tandem de KMT2A (KMT2A-PTD) contribue à la leucémogénèse par l'hyperméthylation de l'ADN. Les translocations impliquant ce gène entraînent la formation d'une protéine perdant son rôle de méthyltransférase favorisant ainsi la transformation maligne des cellules. Il existe

de nombreux partenaires de fusion avec KMT2A (environ 80), une des principales fusions est MLLT3-KMT2A ¹²⁴ (Figure 18).

Figure 18 : La fusion MLLT3-KMT2A et la mutation KMT2A associées avec d'autres altérations génétiques dans la LAM	
Altération Génétique	Association avec d'autres anomalies
MLLT3-KMT2A t(9;11)(p21,3;q23,3) (1%)	NRAS 20% FLT3 TKD 10% FLT3 ITD 5% MECOM (40%)
KMT2A-PTD (5%)	Caryotype normal Trisomie 11 RUNX1

L'ensemble de ces aberrations génétiques ne représente qu'une partie des anomalies responsables du développement des LAM. Mais il est essentiel de mettre en évidence et de caractériser ces aberrations afin de diagnostiquer les LAM et de proposer la meilleure stratégie thérapeutique. Les différentes classification et recommandations (FAB, ELN, OMS) permettent de mettre en place des stratégies communes dans le traitement des LAM.

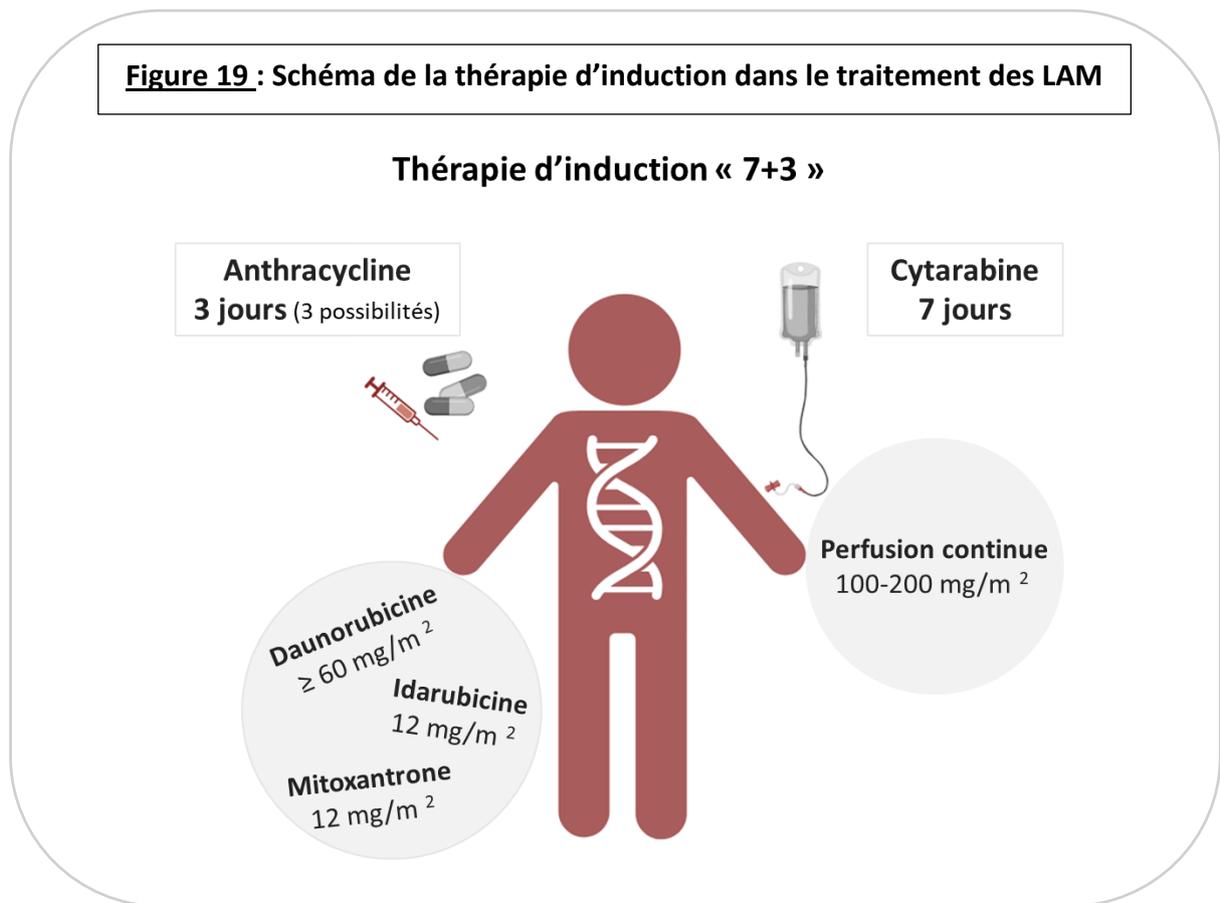
VII- Les stratégies thérapeutiques de la LAM

1) Le traitement de référence :

De par l'évolution rapide de la maladie, la vie des patients est ainsi mise en jeu à court terme en absence de traitement. Un traitement de référence est ainsi proposé aux patients atteints de LAM (Figure 19). Il repose sur une chimiothérapie intensive caractérisée par plusieurs étapes. Ce traitement provoque des effets secondaires importants, avec une forte réponse inflammatoire, de la fièvre, des douleurs osseuses pouvant aller jusqu'à des malaises ¹²⁵.

La première étape correspond à une thérapie d'induction visant à obtenir une rémission complète chez les patients afin de restaurer une hématopoïèse normale. Cette première ligne de traitement se base sur le schéma thérapeutique communément appelé « 7+3 ». Le traitement consiste en la combinaison d'une anthracycline pendant 3 jours et 7 jours de cytarabine (AraC) en perfusion continue ^{87,88}. Les anthracyclines sont une famille de molécules s'intercalant dans les paires de bases azotées de l'ADN et inhibent l'activité de la topoisomérase II. La cytarabine est un antimétabolite, analogue nucléosidique de la cytosine, qui va s'intercaler au niveau de l'ADN pour inhiber sa synthèse.

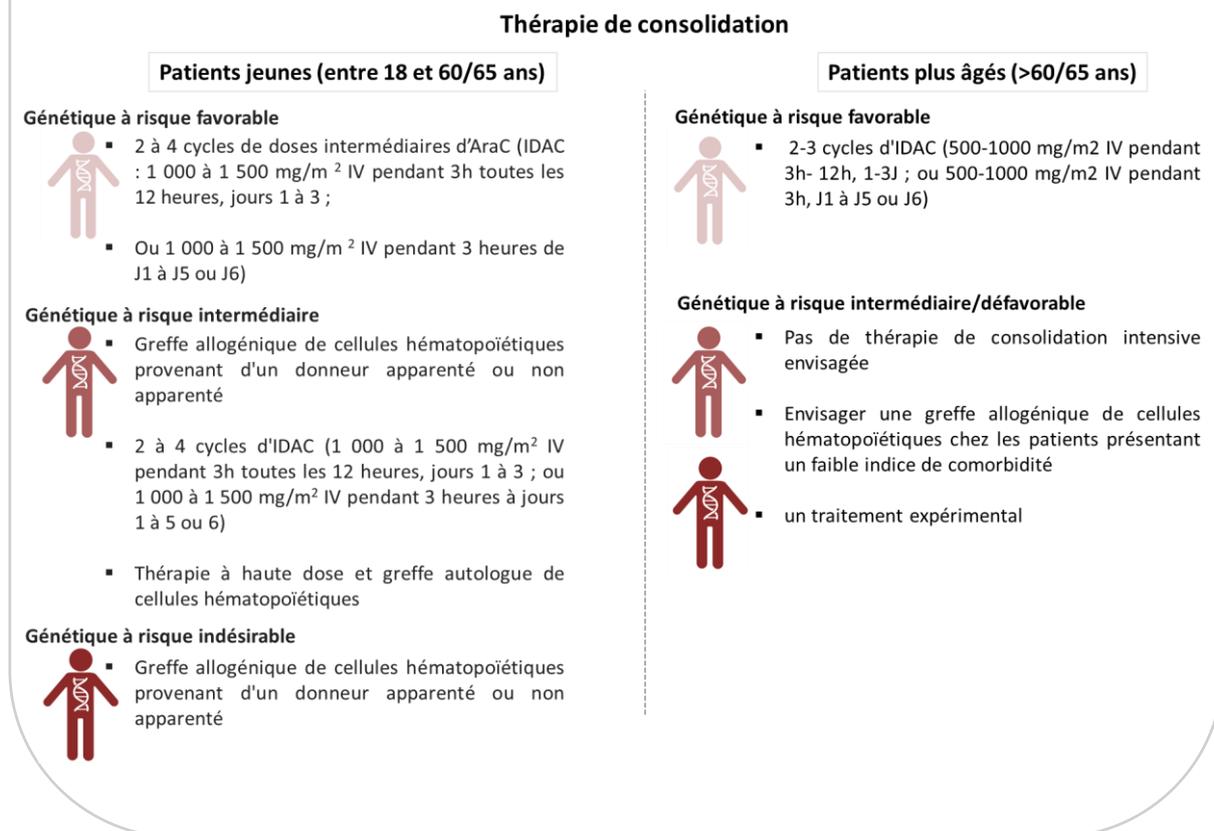
Figure 19 : Schéma de la thérapie d'induction dans le traitement des LAM



Suite à la première phase d'induction, la rémission complète (proportion de blastes résiduels dans la moelle osseuse <5%) des patients est obtenue chez 60 à 80% des jeunes adultes et chez 40 à 60% des personnes de 60 ans ou plus. Le schéma thérapeutique « 7+3 » sera adapté en fonction de la réponse du patient à la cure d'induction. Par exemple si ce dernier ne répond pas à l'anthracycline, un deuxième cycle d'induction pourra être proposé ainsi que des doses plus importantes de cytarabine.

La deuxième partie du traitement est suivie par une thérapie de consolidation (Figure 20) afin de maximiser les effets de la thérapie. Cette dernière sera définie en fonction de l'âge du patient et dépendra de la classification de la LAM (risque favorable, intermédiaire et indésirable).

Figure 20 : Schéma de la thérapie de consolidation dans le traitement des LAM



Les patients peuvent également recevoir le traitement de référence sous une autre forme. Ce composé est le CPX-351, une formulation liposomale qui encapsule la cytarabine et la daunorubicine ¹²⁶. Cette amélioration du traitement conventionnel permet d'obtenir une meilleure absorption du composé thérapeutique avec moins d'effets indésirables. Il a été démontré que le CPX-351 s'accumule dans la moelle et est préférentiellement absorbé par les cellules leucémiques que par les cellules saines ¹²⁷.

Les greffes de cellules hématopoïétiques sont un choix thérapeutique essentiel et sont proposées à des patients présentant un risque pronostic défavorable et également intermédiaire. Les greffes sont aussi proposées en thérapie de consolidation notamment pour les patients en rémission complète mais présentant un risque de rechute estimé entre 35 et 40% ¹²⁸. L'évaluation de la maladie résiduelle mesurable (MRD) oriente le choix thérapeutique en faveur d'une greffe. La maladie résiduelle mesurable est la quantification des cellules leucémiques après traitement. Il existe des greffes de cellules hématopoïétiques autologues ou allogéniques. Bien que la greffe autologue reste peu utilisée, elle offre une option

thérapeutique chez les patients ne pouvant recevoir une greffe allogénique. Les greffes offrent de meilleures chances de guérison chez les patients qui rechutent après une chimiothérapie initiale et chez les patients avec une maladie primaire réfractaire ¹²⁹.

Il existe une dernière étape, la thérapie d'entretien. Cependant il n'existe pas de définition précise pour cette phase de traitement. L'objectif de cette étape selon la Food and Drug Administration (FDA) est de délivrer un traitement peu toxique capable de réduire le risque de rechute chez les patients atteints de LAM. Généralement le traitement d'entretien est donné aux patients ayant obtenu une rémission complète à la suite d'une chimiothérapie intensive. Une étude a montré le bénéfice d'un traitement d'entretien avec de l'**Azacitidine** chez les patients atteints de LAM sans mutation FLT3, il est montré une meilleure survie par rapport aux patients n'ayant pas reçu une cure d'entretien ¹³⁰. Les patients ayant reçu de la **Midostaurine** durant les phases d'induction et de consolidation peuvent continuer à utiliser cette molécule pour le traitement d'entretien notamment pour les patients mutés pour FLT3 ¹³¹.

Les LAM sont des cancers d'évolution rapide ¹³². Il est donc fréquent que les patients soient traités immédiatement avec le traitement de référence afin de ralentir la progression de la maladie. Les analyses complémentaires pour identifier la présence d'anomalies génétiques prennent souvent plusieurs jours. Le traitement pourra être ensuite adapté en fonction des résultats des analyses génétiques. La réponse au traitement est également évaluée rapidement, souvent dès le premier cycle de traitement (entre 14 et 21 jours). Cela permet de vérifier la réponse au traitement des patients et de pouvoir adapter ce dernier en cas d'échec thérapeutique ou d'évolution de la maladie.

2) « Schéma de sauvetage »

Le traitement de « sauvetage » (Figure 21) est proposé pour des patients pouvant subir un traitement intensif mais présentant une rechute de la maladie ou n'ayant pas répondu à 2 cycles de traitement intensif (patients réfractaires). Pour cela un « schéma de sauvetage » est proposé pour les patients réfractaires au traitement ou en rechute. La maladie récidivante se définit avec un taux de blastes leucémiques dans la moelle $\geq 5\%$ et une réapparition de blastes dans le sang périphérique.

a) Candidat à un traitement intensif

Chez les patients pouvant subir une nouvelle cure de traitement intensif, plusieurs options thérapeutiques seront proposées, avec souvent une combinaison de plusieurs molécules. Il sera alors possible de proposer un deuxième cycle de traitement avec des **doses intermédiaires de cytarabine** avec ou sans anthracycline.

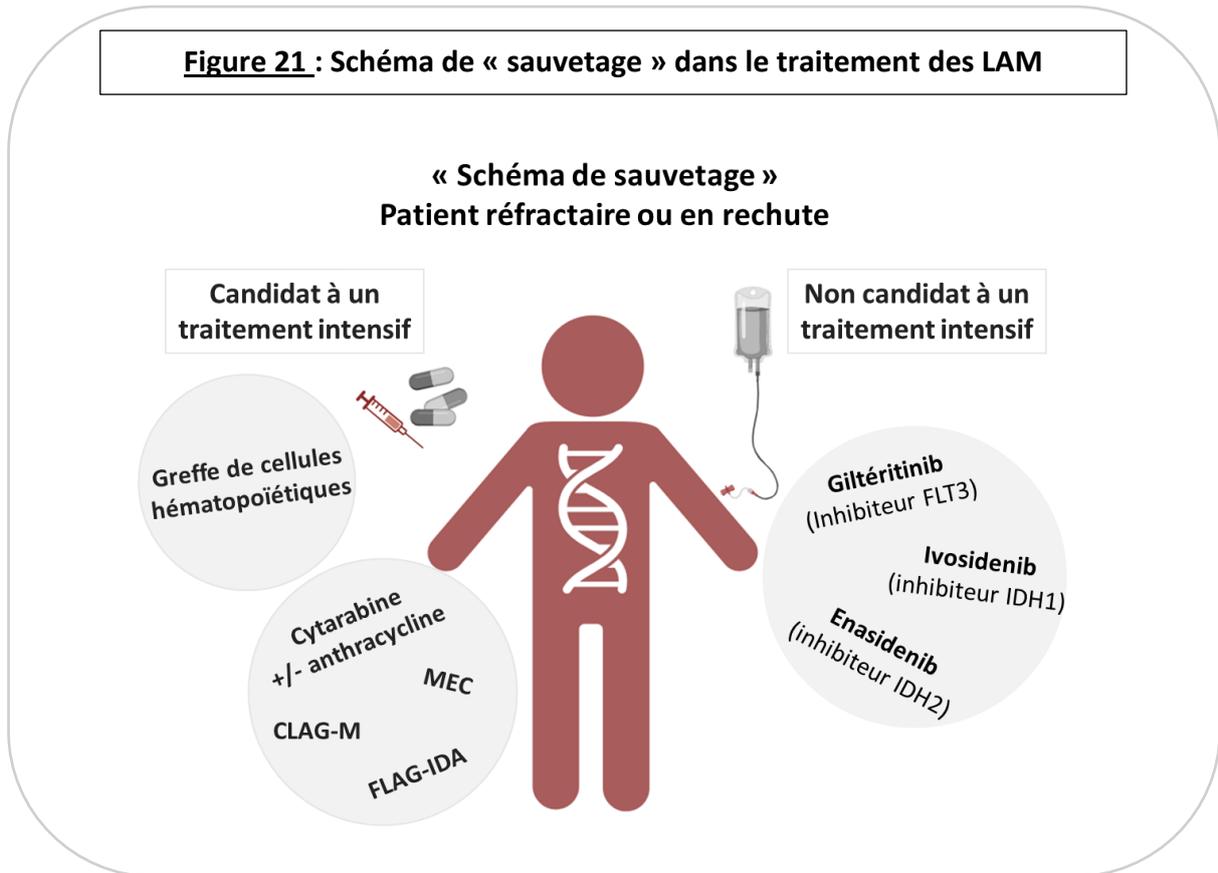
Un autre traitement sera proposé aux patients, il s'agit du **FLAG- IDA**. Ce traitement est une combinaison de plusieurs molécules : le fludarabine, la cytarabine à haute dose, du G-CSF et de l'idarubicine. Ce traitement est une combinaison de plusieurs molécules de chimiothérapie dont la fludarabine, c'est un antinéoplasique puissant pouvant avoir des effets indésirables importants. Le **MEC** est une autre possibilité, c'est une combinaison de mitoxantrone (anthracycline), de cytarabine et d'étoposide qui est un inhibiteur de la topoisomérase II, inhibant l'entrée des cellules en mitose. Le **CLAG-M** est un traitement avec de la cladribine (analogue de l'adénosine), de la cytarabine, de la mitoxantrone (anthracycline) et du G-CSF.

Il pourra être envisagé de réaliser des **greffes** de cellules hématopoïétiques chez les patients réfractaires aux traitements (LAM primaire), chez les patients en deuxième rémission complète ou bien chez les patients présentant un nombre de blastes réduits mais avec une maladie toujours active après un « traitement de sauvetage ».

b) Non candidat à un traitement intensif

Certains patients ne peuvent subir une autre cure de traitement intensif. Il faudra alors mettre en place des alternatives thérapeutiques. Par exemple chez les patients présentant des mutations mais ne pouvant subir un traitement avec de la chimiothérapie intensive, l'utilisation de la thérapie ciblée sera alors une des meilleures options thérapeutiques.

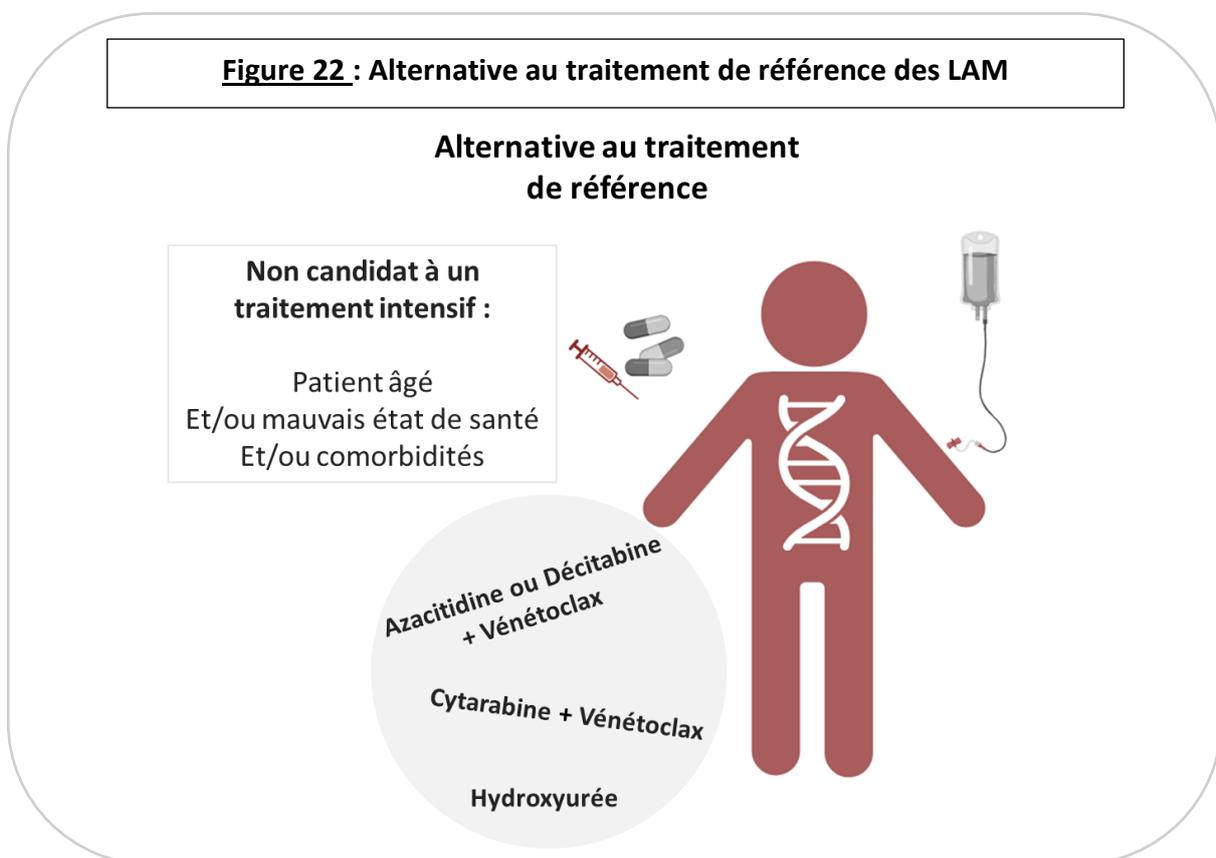
Figure 21 : Schéma de « sauvetage » dans le traitement des LAM



3) Alternative au traitement de référence (chimiothérapie intensive) :

Cependant certains patients ne sont pas éligibles à une chimiothérapie intensive. En effet des patients plus âgés, en mauvais état de santé et/ou présentant des comorbidités ne sont pas éligibles à une chimiothérapie intensive. De plus certaines patients supportent mal le traitement (malgré une rémission complète de la maladie) et ont un risque de mortalité lié au traitement élevé¹³³. Pour les patients non candidats à une chimiothérapie intensive, plusieurs choix thérapeutiques moins invasifs seront proposés et sont approuvés par l'agence européenne des médicaments (EMA) et/ou par la Food and Drug Administration (FDA). L'option thérapeutique (Figure 22) se tourne vers des chimiothérapies moins intensives ainsi que des agents hypométhylants. Une cure avec de l'**Azacitidine** ou de la **Décitabine** peut être proposée en cure de plusieurs jours à renouveler toutes les 4 semaines. L'Azacitidine est un analogue de la cytidine, qui va inhiber la synthèse de l'ADN et de l'ARN, et bloquer la prolifération cellulaire. L'incorporation dans l'ADN entraîne également l'inactivation de méthyltransférases ce qui engendre une hypométhylation de l'ADN. La Décitabine est un agent hypométhylant qui inhibe l'action des méthyltransférases. Des cures de cytarabine à faible dose (20mg toutes les 12h pendant 1 à 10 jours, renouvelable toutes les 4 semaines)

sont également proposées. Ce traitement n'est cependant pas recommandé chez les patients à risque défavorable. Ces molécules thérapeutiques peuvent être proposées en combinaison avec du Vénétoclax. Cette molécule est un puissant inhibiteur de la protéine anti-apoptotique BCL-2 (B-cell lymphoma 2). La combinaison de l'Azacitidine ou de la Décitabine avec du **Vénétoclax** a amélioré la réponse clinique des patients ¹³⁴. Pour les patients ne pouvant recevoir un traitement hypométhylant, la **cytrabine** à faible dose avec du Vénétoclax semble être une alternative intéressante ¹³⁵. Il pourra également être proposé des soins d'entretiens avec de l'**hydroxyurée** pour les patients ne pouvant tolérer aucun traitement ou simplement pour ceux non désireux de subir un traitement.



La recherche de nouveaux traitements et de nouvelles combinaisons de molécules est cruciale pour l'amélioration thérapeutique des patients atteints de LAM. L'utilisation d'autres traitements que la chimiothérapie de référence est donc essentielle. L'avancée technologique comme le séquençage permet de mieux caractériser les LAM afin d'utiliser par exemple les mutations comme cibles thérapeutiques. De nombreux essais cliniques ont permis de développer d'autres traitements comme les thérapies ciblées ou encore l'immunothérapie.

4) Les thérapies ciblées

Avec l'évolution des technologies comme le séquençage, de nombreuses mutations impliquées dans le développement des LAM ont été mis en évidence. De nouveaux traitements ciblés ont donc été développés. Il est également essentiel d'avoir une caractérisation rapide du sous type de LAM pour prescrire le traitement le plus adapté ¹³⁶.

Les Inhibiteurs de FLT3 :

La mutation du gène FLT3 est parmi la plus courante dans les LAM. Le traitement des LAM mutantes pour FLT3 repose sur un traitement d'induction et de consolidation classique avec ajout d'une autre molécule dès l'étape d'induction. La midostaurine est le premier inhibiteur de FLT3 à être approuvé pour le traitement des LAM. La midostaurine possède une activité inhibitrice multi-kinase et peut être utilisée pour d'autres mutations comme KIT, PKC, VEGF. L'utilisation de **Midostaurine** dès la phase d'induction en complément du traitement de référence a amélioré la survie globale des patients de 7.1% chez les patients de 18 à 59 ans ¹³¹. De plus, un traitement d'entretien en monothérapie avec de la Midostaurine pendant 1 an permet de réduire le nombre de rechutes chez les patients atteints de LAM mutée FLT3 ¹³⁷. Deux autres essais cliniques ont mis en évidence le bénéfice de deux autres inhibiteurs de FLT3 de deuxième génération : le **giltéritinib** et le **quizartinib** (FLT3-ITD uniquement) ¹³⁸. Chez les patients mutés FLT3 mais ne pouvant pas avoir de chimiothérapie intensive ou ayant déjà eu un premier cycle de chimiothérapie intensive sans succès ou en rechute, il sera plus judicieux d'utiliser le giltéritinib.

D'autres phases de tests sont actuellement en cours afin d'identifier le potentiel thérapeutique d'autres molécules comme par exemple les agents hypométhylants avec l'**Azacitidine** ¹³⁹ et le **vénetoclax** (référence essais clinique : NCT05520567) ¹⁰⁶. Ces agents seraient utilisés en association avec des traitements existants (inhibiteurs de kinase et/ou anthracycline et/ou cytarabine).

Il existe d'autres inhibiteurs de FLT3 comme le **sorafénib** qui peuvent être utilisés en combinaison avec d'autres inhibiteurs comme la midostaurine, le giltéritinib ou avec des hypométhylants comme l'azacitidine mais également après une greffe de cellules souches. En effet les patients présentant des mutations FLT3-ITD sont généralement de bons candidats

pour une greffe allogénique. Cet inhibiteur multi-kinase (sorafénib) a démontré un bénéfice en traitement d'entretien et réduirait le risque de rechute ¹⁴⁰.

Les Inhibiteurs IDH 1 et IDH 2 :

Les mutations IDH1^{R132} et IDH2^{R140} / IDH2^{R172} sont fréquentes dans les LAM et souvent associées à un caryotype normal. Ces mutations perturbent le métabolisme cellulaire et la régulation épigénétique contribuant à l'oncogenèse via la surproduction d'un onco-métabolite (2-hydroxyglutarate). L'émergence des thérapies ciblées a permis le développement des inhibiteurs sélectifs des enzymes IDH. L'**ivosidenib** est un inhibiteur puissant de l'IDH1 mutant. Cet inhibiteur est utilisé en monothérapie chez les patients ne pouvant recevoir une chimiothérapie intensive ¹⁴¹. Il pourra également être proposé en deuxième intention chez les patients réfractaires au traitement intensif ou en rechute et ne pouvant subir à nouveau une thérapie intensive. Une étude récente a démontré le potentiel thérapeutique de l'ivosidenib en combinaison avec de l'**Azacitidine** par rapport au patient traité uniquement avec l'inhibiteur ¹⁴². Cette option thérapeutique semble augmenter la rémission complète des patients et prolonge la survie globale des patients atteints de LAM mutée pour IDH1 (référence essais clinique : NCT03173248).

Un autre inhibiteur de IDH1 a été approuvé en décembre 2022 par la FDA, il s'agit de l'**olutasidenib** ¹⁴³. Cet inhibiteur pourra être utilisé chez les patients atteints de LAM en rechute ou réfractaire aux traitements.

L'**énasidenib** est un inhibiteur du mutant IDH2, utilisé en monothérapie chez les patients réfractaires aux thérapies intensives ou en rechute et ne pouvant pas bénéficier d'un traitement intensif ¹⁴⁴. Des essais sont en cours afin de montrer le bénéfice d'associer de l'**azacitidine** avec l'énasidenib. La rémission complète des patients est augmentée par la combinaison de ces 2 molécules.

L'association des inhibiteurs IDH1 et IDH2 avec une chimiothérapie intensive chez les patients en bonne forme physique est actuellement en cours d'évaluation dans un essai clinique de phase 3 (NCT03839771).

Les Inhibiteurs de l'apoptose :

Le **Vénétoclax** est un inhibiteur de BCL-2 approuvé en 2018. La protéine anti-apoptotique BCL-2 est surexprimée dans les LAM notamment dans les cellules souches leucémiques responsables de la chimiorésistance et des rechutes ¹⁴⁵. Il est préconisé chez les patients inaptes à recevoir un traitement d'induction standard (comorbidités) et/ou âgés. Cet agent en monothérapie ne semble pas avoir d'efficacité en revanche lorsqu'il est associé à des agents hypométhylants ou à de la cytarabine à faible dose, le taux de rémission complète augmente ¹³⁵. Il a également été mis en évidence que le taux de rémission complète est supérieur à 70% chez les patients présentant la mutation IDH1/2 et traités avec de l'Azacitidine et du Vénétoclax. Des résultats préliminaires semblent montrer un bénéfice thérapeutique lorsque que l'on associe en plus de l'ivosidenib. Ainsi la combinaison thérapeutique devient une nouvelle norme chez les patients atteints de LAM. Au-delà d'une population de patients inaptes aux traitements intensifs, des études en cours laissent penser que le Vénétoclax est susceptible de devenir un traitement de choix combiné à d'autres molécules dans le traitement de nombreuses LAM ^{146,147}.

5) L'immunothérapie

L'immunothérapie est utilisée pour traiter de nombreuses maladies comme par exemple les lymphomes. De nouvelles technologies sont développées pour traiter les LAM en utilisant des anticorps monoclonaux ciblant les antigènes de surface exprimés par les cellules leucémiques, ciblant les points de contrôle immunitaire ou bien encore des anticorps bispécifiques ou conjugués à des molécules thérapeutiques ^{148,149}.

Inhibiteurs des points de contrôle immunitaire :

Plusieurs inhibiteurs des points de contrôle immunitaire ont montré leur efficacité dans le traitement des LAM comme par exemple inhibiteur anti-CD47 ou anti CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4). L'antigène CD47 est exprimé par les cellules tumorales et inhibe la phagocytose par les macrophages ¹⁵⁰. Le **magrolimab** est un anticorps anti CD47 et est efficace dans le traitement des LAM seules ou en combinaison avec des agents hypométhylants comme l'azacitidine. L'utilisation de cet anticorps va bloquer l'activité du CD47 afin d'induire la phagocytose des cellules tumorales. Des essais cliniques ont montré le bénéfice de cette thérapie chez les patients réfractaires ou en rechute ¹⁵¹ (NCT03248479).

CTLA-4 (CD152) est un récepteur présent sur les lymphocytes T qui inhibe les réponses immunitaires. L'utilisation d'inhibiteurs de CTLA-4 comme l'**ipilimumab** permet d'activer les lymphocytes T et aide le système immunitaire à lutter contre la progression tumorale. Des études sont actuellement en cours pour évaluer la meilleure dose à utiliser et il est également utilisé en combinaison avec de la décitabine chez les patients en rechute ou réfractaires (NCT02890329).

Les Anticorps conjugués à un médicament :

CD33 est un antigène de différenciation myéloïde et est exprimé dans 90% des cellules leucémiques. Le **Gemtuzumab ozogamicine** est un anticorps monoclonal anti CD33 lié à la calicheamicine, un agent cytotoxique provoquant la cassure double brin de l'ADN ¹⁵². Il est préconisé pour les patients atteints de LAM-CD33 positive avec un risque cytogénétique favorable ou intermédiaire. Cette molécule est utilisée en association avec le traitement de référence dès le 1^{er} cycle de traitement et également pour les patients réfractaires ou en rechute. La FDA a étendu son utilisation aux enfants atteints de LAM à partir de l'âge de 1 mois.

Un autre anticorps ciblant le CD33 est le **vadastuximab talirine**, l'anticorps CD33 est attaché à un dimère de pyrrolobenzodiazépine, un agent de liaison à l'ADN très puissant¹⁵³. L'utilisation de cet agent seul ou en combinaison avec la chimiothérapie intensive a montré une efficacité prometteuse (essai clinique NCT02326584).

Les Anticorps bispécifiques :

Des anticorps bispécifiques (BiTE) sont également développés ¹⁵⁴, il s'agit d'anticorps se fixant simultanément à un antigène tumoral comme par exemple le CD33 et au récepteur CD3 à la surface des cellules T afin d'activer les lymphocytes T et d'entraîner la lyse des cellules tumorales. Actuellement des essais cliniques en phase I sont en cours pour développer des anticorps BiTE CD33/CD3 tel que AMG 330, GEM333 ou encore AMG 673 (NCT02520427, NCT03516760, NCT03224819).

Les cellules CAR-T :

La technologie des cellules CAR-T (Chimeric Antigenic Receptor-T) consiste à modifier les lymphocytes T issus du patient afin de leur faire exprimer des récepteurs chimériques ciblant un antigène cible. Ces cellules seront ensuite réinjectées chez les patients afin d'éliminer les cellules exprimant l'antigène cible ¹⁵⁵. Cependant cette technologie a ses limites car de nombreux antigènes sont exprimés par les cellules saines. Mais plusieurs études sont actuellement en cours avec des cellules CAR T ciblant des antigènes comme le CD33 ¹⁵⁶, CD38, CD7 ¹⁵⁷, CLL-1 ¹⁵⁸, CD56, CD123 ¹⁵⁹.

Les vaccins :

Actuellement des recherches sont en cours pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques et plus particulièrement le développement de vaccins. Un des objectifs était de développer un vaccin peptidique, c'est-à-dire diriger contre les antigènes tumoraux pour induire une réponse immunitaire. Des études sont menées sur les vaccins à peptides WT1 (Wilms 1) ¹⁶⁰, facteur de transcription impliqué dans la prolifération tumorale ¹⁶¹. Cependant malgré des résultats intéressants, le bénéfice des vaccins dans le traitement des LAM n'est pas approuvé. De nombreuses recherches sont en cours pour comprendre et développer les vaccins dans le but de traiter les patients atteints de LAM.

6) Les agents différenciants

L'acide tout trans-rétinoïque (ATRA) :

Un sous-type particulier de LAM (sous-type M3 ou LAP) est traité en utilisant une chimiothérapie intensive associée avec un agent différenciant **l'acide tout trans-rétinoïque** (ATRA) et de l'arsenic tri oxyde (ATO). Pour rappel la LAP est caractérisée par la translocation chromosomique t(15 ; 17) qui fusionne les gènes PML et RAR α aboutissant à la synthèse de l'oncoprotéine PML-RAR α qui bloque les cellules au stade de promyélocyte.

L'ATRA est un métabolite de la vitamine A contrôlant des fonctions physiologiques essentielles de nombreux processus comme la vision, la reproduction, la croissance et la différenciation de tissus et des cellules hématopoïétiques. Elle est impliquée dans la différenciation terminale des progéniteurs myéloïdes.

Une fois dans la cellule, l'ATRA se fixe sur les récepteurs à l'acide rétinoïque (RAR) ¹⁶². Il existe plusieurs isoformes de ce récepteur (α , β , γ). Le récepteur RAR s'hétérodimérise avec le récepteur X aux rétinoïdes (RXR) et se lie sur des séquences d'ADN RARE (Retinoic Acid Response Element) au niveau de promoteur/amplificateur de gènes cibles. En présence du ligand (ATRA), un changement de conformation de l'hétérodimère RAR-RXR va permettre le recrutement de complexes coactivateurs comme les histones acétyltransférases (HAT) agissant sur la décondensation de la chromatine et permettant une activation transcriptionnelle des gènes. En absence d'ATRA, l'hétérodimère va recruter des complexes répresseurs ainsi que des histones désacétylases (HDAC) inhibant l'expression des gènes ¹⁶³. La protéine de fusion PLM-RAR α va recruter des corépresseurs transcriptionnels au niveau des promoteurs ainsi que des histones désacétylases et des enzymes responsables de l'hyperméthylation de l'ADN. Tout cela conduit à une répression de la transcription de gènes cibles de l'ATRA essentielle à la différenciation myéloïde ¹⁶⁴.

Il a été mis en évidence que l'utilisation de doses élevées d'ATRA permet la dissociation des corépresseurs, le recrutement de coactivateurs transcriptionnels mais également la dégradation de la protéine de fusion PLM-RAR α . Il y a 50 ans la LAP était considérée comme le sous-type de LAM le plus mortel mais aujourd'hui l'utilisation d'ATRA pour traiter la LAP entraîne une différenciation terminale des cellules et conduit à une rémission complète avec un taux de survie d'environ 90% à deux ans ¹⁶⁵. L'utilisation de trioxyde d'arsenic dans le traitement des LAP semble prévenir la récurrence et prolonger la survie des patients ¹⁶⁶. Ces avancées ont permis à la LAP de devenir la forme la plus curable.

Cependant une thérapie de différenciation dans les LAM non LAP donne des résultats mitigés, suggérant que les patients présentent une sensibilité à la vitamine A plus ou moins importante. Il a également été montré que les LAM avec des mutations NPM1 ou IDH2 présentaient une sensibilité à l'ATRA ¹⁶⁷. Actuellement le bénéfice d'un traitement avec de l'ATRA des LAM non LAP n'est pas suffisamment clair pour l'inclure dans une stratégie thérapeutique des LAM. D'autres recherches devront confirmer ou non le potentiel thérapeutique de l'ATRA pour d'autres sous-types de LAM.

La vitamine D :

La **vitamine D3** est liposoluble, on la retrouve dans l'alimentation et dans l'organisme sous forme de cholestérol. Au niveau de la peau les rayonnements ultraviolets permettent la synthèse de la pré-vitamine D3 à partir de dérivé du cholestérol (le 7-déshydrocholestérol) présent dans l'organisme ¹⁶⁸. Ce composé va être isomérisé en vitamine D3 (ou cholécalférol). La vitamine D3 (alimentation ou dérivé du cholestérol) sera hydroxylé par le foie en 25-hydroxyvitamine D3 (25(OH)D3 ; forme de réserve de la vitamine D3). Ce dernier sera hydrolysé par les reins en 1,25-dihydroxyvitamine D3 (1,25(OH)2D3), la forme active de la vitamine D3.

La forme biologiquement active de la vitamine D3 va se fixer au récepteur à la vitamine D (VDR). Le VDR est un récepteur nucléaire jouant le rôle de facteur de transcription. En présence de son ligand (la vitamine D3). Le VDR s'hétérodimérise avec le récepteur X aux rétinoïdes (RXR) afin d'induire l'expression de gènes cibles. Cet hétérodimère va se fixer au niveau des éléments de réponse à la vitamine D (VDRE) dans les régions promotrices des gènes. Le complexe VDR-RXR recrute des complexes protéiques activateurs (dont HAT) ou répresseurs (dont HDAC). Cela va favoriser la décondensation ou condensation de la chromatine conduisant à la régulation de l'expression génique.

Il existe une action non génomique de la vitamines D3 impliquant une forme membranaire du récepteur à la vitamine D (VDR), à l'origine d'une régulation rapide de voies de signalisation comme la voie des MAPK ou PI3K-Akt. Par la régulation des voies de signalisation, la vitamine contrôle indirectement la transcription de certains gènes ¹⁶⁹.

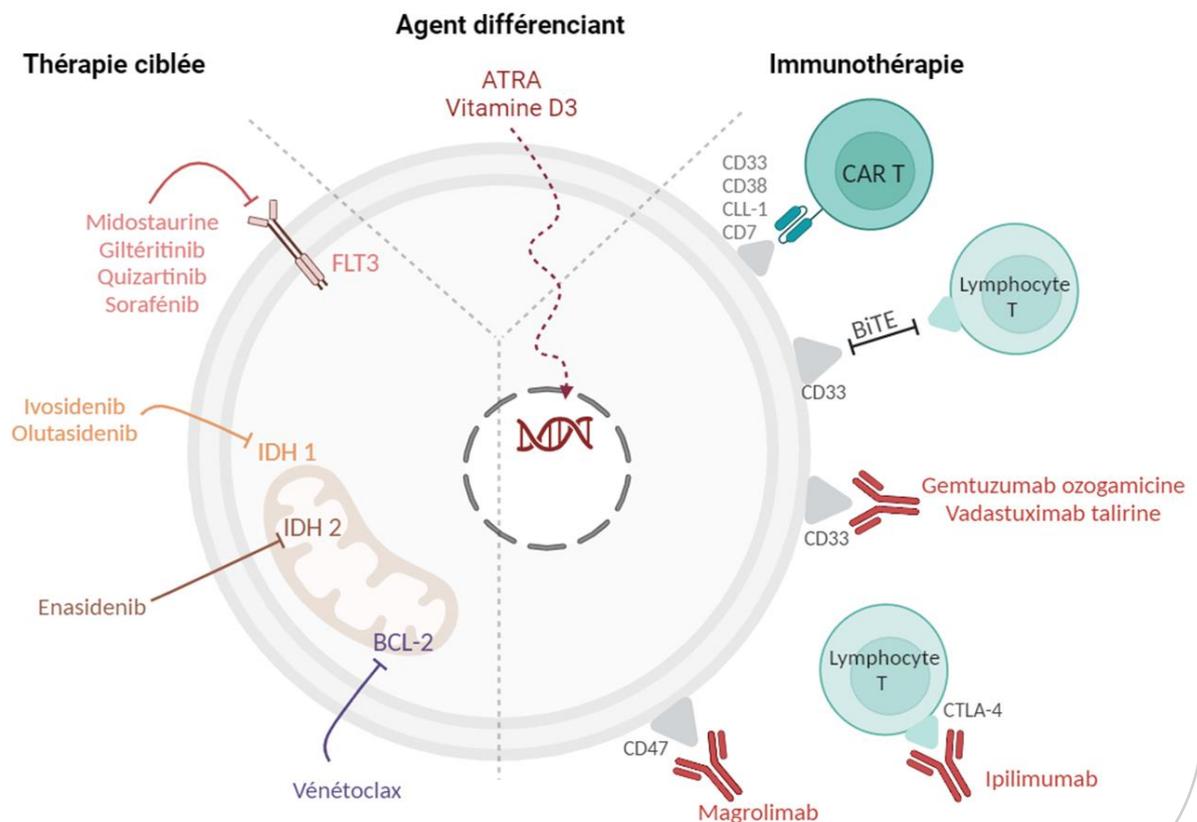
La vitamine D3 intervient dans l'absorption du calcium et du phosphore au niveau de l'intestin. Elle est également nécessaire pour la minéralisation osseuse, et le développement chez l'enfant. De nombreuses recherches ont mis en évidence un large spectre d'action de la vitamine D3 incluant la régulation de la prolifération, de la différenciation et de l'apoptose. Le rôle de la vitamine D dans l'induction de la différenciation des progéniteurs myéloïdes en monocytes est connu depuis longtemps ^{170,171}.

Une étude récente vient de mettre en évidence le bénéfice d'une supplémentation en vitamine C et D chez les patients subissant une chimiothérapie intensive. Depuis 2018 les deux vitamines sont ajoutées aux soins de soutien. Pendant le traitement les patients ont un taux

plus faible d'infection bactérienne ou d'hémorragie par rapport à ceux n'ayant pas de supplémentation. La survie globale est améliorée chez les patients supplémentés en vitamines C et D et présentant la mutation NPM1 ¹⁷².

Des recherches ont récemment mis en évidence que l'azacitidine augmente l'expression du VDR dans les cellules LAM, en effet l'expression de VDR est régulée négativement par la méthylation de l'ADN. L'expression du VDR est associée à la différenciation des monocytes. L'association de l'azacitidine (hypométhyliant) et de la vitamine D augmente la différenciation des blastes. L'utilisation d'hypométhyliants pourrait améliorer l'efficacité de la vitamine D3 chez les patients atteints de LAM ¹⁷³ et pourrait peut-être devenir une stratégie thérapeutique.

Figure 23 : Les différentes stratégies thérapeutiques alternatives au traitement de référence dans les LAM



Cependant malgré toutes les possibilités de traitements, les LAM présentent de nombreuses rechutes et une survie globale à 5 ans relativement faible. Les traitements des LAM font l'objet de nombreuses recherches permettant l'amélioration continue de la prise en charge des patients. Nous avons décrit ici qu'une partie des thérapies proposées. De nombreux essais cliniques sont en cours pour améliorer la survie globale des patients. Il existe énormément de cibles thérapeutiques qui sont en expérimentation comme les inhibiteurs des voies de signalisation avec par exemple le glasdegib un inhibiteur de la voie Hedgehog, ou la rapamycine pour la voie PI3K/AKT ¹⁷⁴. En effet les patients atteints de LAM ont un faible taux de survie globale avec de nombreuses rechutes. Un réservoir de cellules leucémiques peut expliquer les rechutes des patients atteints de LAM. Plus de 50% des patients en rémission complète finissent par rechuter en raison de la maladie résiduelle. En effet un petit nombre de cellules leucémiques résistent aux traitements à l'origine des rechutes. En effet l'organisation hiérarchique de l'hématopoïèse est maintenue dans les LAM, il semble que les cellules souches leucémiques (CSL) soient un réservoir de cellules impliquées dans la résistance aux chimiothérapies et responsables des rechutes. En effet, il est retrouvé peu de cellules souches leucémiques au sommet de l'hématopoïèse ¹⁷⁵ mais ces cellules ont des capacités d'auto-renouvellement illimitées ainsi que des propriétés réversibles de prolifération, de différenciation et aussi de quiescence ^{95,176}. Cela peut expliquer l'inefficacité des traitements, le faible taux de survie à 5 ans, et les nombreuses rechutes des patients atteints de LAM ¹⁷⁷.

VIII- Transformation maligne et développement des LAM

L'acquisition progressive d'aberrations génétiques et épigénétiques au sein des cellules souches et les progéniteurs hématopoïétiques reprogramme et transforme le système hématopoïétique sain ¹⁷⁸, favorisant ainsi le développement des leucémies. La transformation maligne provoque une dérégulation de l'auto-renouvellement favorisant un épuisement du compartiment des cellules souches et progénitrices immatures, ainsi qu'un blocage de la différenciation des cellules entraînant l'accumulation de progéniteurs leucémiques dysfonctionnels dans la moelle osseuse ou dans d'autres organes hématopoïétiques. La malignité résulte de l'accumulation de mutations qui dérégulent l'auto-renouvellement, inhibent la différenciation et activent la prolifération des cellules. Les mutations dérégulent

l'auto-renouvellement des CSH entre en synergie avec des mutations qui entraînent la prolifération et font basculer les systèmes hématopoïétiques à un état de malignité⁴⁰.

L'acquisition des mutations peut commencer très tôt dans l'évolution de l'état pré-leucémique mais les mutations leucémiques peuvent également apparaître au sein de clones plus engagés en différenciation. L'évolution clonale des blastes leucémiques est basée sur l'acquisition de plusieurs mutations dans les CSH et les progéniteurs conduisant à un état pré-leucémique¹⁷⁹ puis leucémique (Figure 24). L'acquisition d'une mutation (DNMT3, TET2, ASXL1, SF3B1) dans une seule CSH entraîne un avantage prolifératif d'un clone, ainsi toute la descendance hérite de la même mutation. On parlera alors d'un état pré-leucémique. Les CSH pré-leucémiques conservent leur capacité de différenciation et peuvent donner naissance à des cellules matures. En revanche, des mutations supplémentaires (par exemple NPM1, FLT3, IDH1/2, RUNX1, C/EPB α) au sein de ce clone vont transformer les CSH ou progéniteurs pré-leucémiques en cellules leucémiques¹⁸⁰. Ce clone leucémique va proliférer et pourra acquérir de nouvelles mutations générant des sous-clones à l'origine d'une hétérogénéité intratumorale. De plus l'environnement cellulaire et les modifications épigénétiques vont contribuer à l'hétérogénéité des sous-clones leucémiques. Il existe également des LAM avec réarrangement chromosomique¹⁸¹, des translocations uniques ne sont probablement pas suffisantes pour piloter à elles seules la leucémogénèse. Des événements mutationnels supplémentaires seront à l'origine du développement de la leucémie.

L'ensemble de ces mutations/réarrangements chromosomiques crée un déséquilibre à la fois au niveau de l'auto-renouvellement, de la prolifération et de la différenciation des cellules.

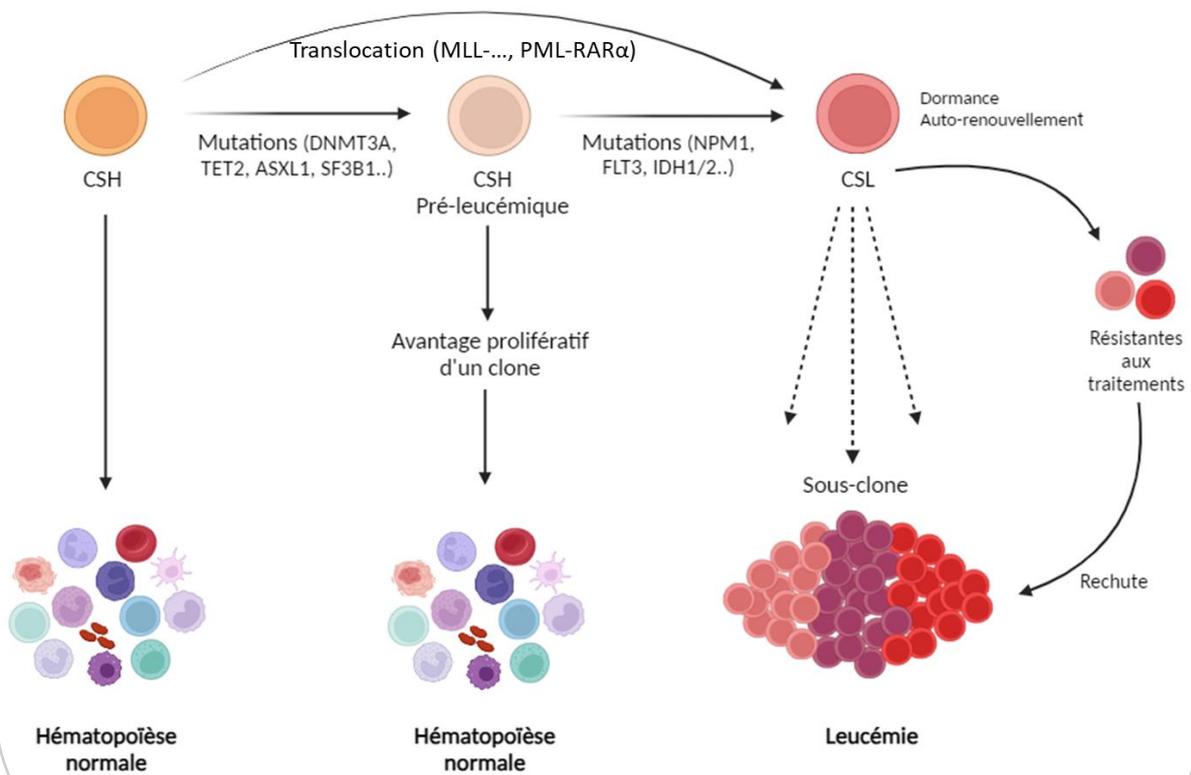
Par exemple la mutation IDH1 joue sur le métabolisme, or ce dernier a un rôle important dans l'activation des CSH mais également dans le maintien de la quiescence. En effet, les ROS peuvent également être produits de façon accrue suite à une dérégulation du métabolisme des CSH ou bien suite à une exposition à des rayonnements, aux UV, à certains médicaments ou encore à l'exposition à des produits chimiques. La présence de ROS de façon importante favorise les dommages à l'ADN et cela peut induire de nouvelles mutations, des aberrations chromosomiques ou bien une transformation cellulaire. La réparation défectueuse de l'ADN est associée à des troubles du système hématopoïétique. Tout cela participe à la transformation maligne des cellules.

Le système hématopoïétique devient vulnérable avec l'âge ¹⁸². Avec le vieillissement, le stress réplicatif, les dommages à l'ADN sont plus fréquents et cela conduit les CSH à accumuler des mutations. L'hématopoïèse clonale liée à l'âge (ARCH) se définit comme l'expansion disproportionnée de clones uniques de CSH par rapport à d'autres et conduit à des cytopénies associées aux syndromes myélodysplasique (SMD). Il est mis en évidence une corrélation entre le vieillissement et le développement d'hémopathie maligne. Cela se retrouve également avec l'incidence des LAM qui augmente avec l'âge.

Fait important, l'organisation hiérarchique du système hématopoïétique est conservée dans les leucémies. Les cellules souches leucémiques (CSL) sont au sommet de l'hématopoïèse et présentent également une capacité d'auto-renouvellement illimitée alimentant les LAM ¹⁷⁵. Les CSL possèdent les mêmes capacités que les CSH et peuvent entrer dans un état réversible de dormance/quiescence. En effet la capacité de dormance/quiescence des CSL leur permet d'échapper à la chimiothérapie, ciblant plutôt les cellules proliférantes. De plus, la présence des CSL au sein de niches semble les protéger également des traitements ¹⁸³. Cela forme un réservoir de cellules souches leucémique à l'origine de la résistance aux chimiothérapies et impliqué dans la rechute de la maladie. En effet, seulement quelques cellules cancéreuses sont capables de régénérer une tumeur par clonage après une thérapie ¹⁷⁶. La rechute des patients provient de quelques cellules leucémiques résistantes au traitement appelées maladie résiduelle minimale (MRD).

De plus, les leucémies possèdent une hétérogénéité intra-tumorale de par la présence de différents sous-clones au côté du clone dominant au sein de la tumeur. Cet ensemble cellulaire hétérogène, avec des capacités de prolifération différentes, travaille ensemble pour maintenir la croissance tumorale. L'hétérogénéité clonale et la présence de CSL soulèvent des problématiques essentielles quant aux traitements des LAM et participent aux nombreuses rechutes des patients atteints de LAM ¹⁸⁴. De plus, l'hétérogénéité tumorale rend le traitement compliqué par la présence de plusieurs mutations. Les différents traitements peuvent également engendrer l'apparition de nouvelles mutations ou réarrangements chromosomiques.

Figure 24 : La transformation du système hématopoïétique sain vers la malignité et le développement des LAM.



Partie III : Contrôle de l'initiation de la traduction

I- Généralités

La régulation de l'expression génique passe par de nombreuses étapes finement régulées. La première est la transcription, c'est un processus permettant de transformer notre ADN en ARN en fonction des différents stimuli ou régulation cellulaire (les cytokines, les facteurs de croissance, facteurs de transcription etc...). Le produit de la transcription est un pré-ARN qui subira différentes étapes de maturation pour pouvoir être pris en charge par la machinerie de traduction. La synthèse des protéines est l'étape finale et le reflet de l'expression des gènes. C'est un processus qui implique une machinerie complexe et finement régulée. Le contrôle traductionnel permet d'adapter le niveau des protéines nécessaire à la cellule pour réguler ces fonctions biologiques comme par exemple la prolifération et la différenciation cellulaire.

Le pré-ARNm subit trois modifications post-transcriptionnelles essentielles pour pouvoir être traduit : l'ajout d'une coiffe à l'extrémité 5', une queue poly-A à l'extrémité 3' et l'épissage. L'ARNm sera alors prêt pour être traduit dans le cytoplasme. La sous-unité 43S du ribosome scanne l'ARNm en partant de l'extrémité 5' afin de trouver le codon d'initiation de la traduction AUG. Une fois le codon trouvé la sous-unité 60S s'associe à la sous-unité 40S pour former le ribosome au complet. L'élongation peut alors commencer, elle consiste en la lecture du code génétique par le ribosome et en l'ajout d'acides aminés pour former la chaîne polypeptidique. La terminaison est caractérisée par la reconnaissance du codon stop, la dissociation des deux sous-unités ribosomales et la libération de l'ARNm. Les sous-unités ribosomales seront recyclées en vue d'une nouvelle initiation de la traduction.

La plupart des ARNm sont traduits par un mécanisme dépendant de la coiffe, il existe cependant d'autres traductions alternatives dépendantes de séquences IRES (Internal ribosome entry site).

II- Modifications post-transcriptionnelles

Les modifications post-transcriptionnelles de l'ARNm représentent l'ensemble des modifications qu'un ARNm doit subir après la transcription pour être mature. Ces modifications sont essentielles pour assurer par la suite une bonne traduction des ARNm en protéines. On ne parlera ici que des principales modifications post-transcriptionnelles.

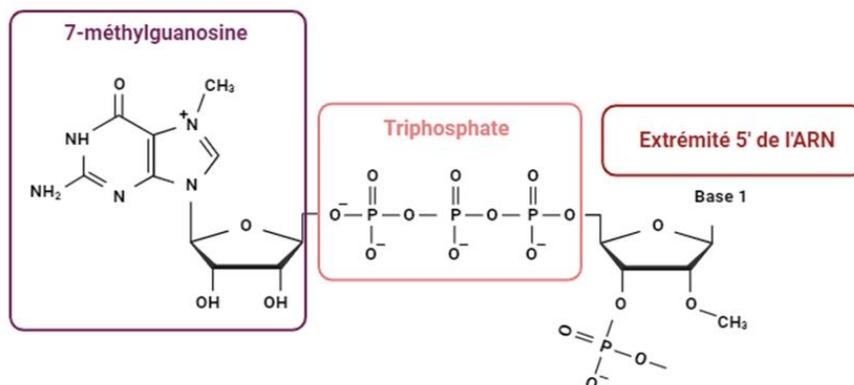
1) L'épissage de l'ARN :

L'ARN doit être épissé dans le noyau de la cellule pour donner un ARNm mature prêt à être traduit en protéine. L'épissage est catalysé par un ensemble de complexes ribonucléoprotéiques appelé spliceosome. Il consiste à éliminer des introns de l'ARN pour ne conserver que les exons. L'ARN mature pourra ensuite être transporté par le cytoplasme.

2) La coiffe

La plupart des ARNm eucaryotes sont pourvus d'une coiffe appelée m⁷G-cap, c'est un nucléotide modifié que l'on trouve à l'extrémité 5' de l'ARNm¹⁸⁵ (Figure 25). Le pré-ARNm possède un nucléotide 5' triphosphate qui sera clivé pour libérer un phosphate. Une guanylyltransférase va modifier l'extrémité 5' de l'ARNm par l'addition d'un groupement guanosyl-monophosphate. Puis un groupe méthyl sera ajouté sur la guanine en position N⁷ par l'action d'une méthyltransférase¹⁸⁶. On obtient donc un 7-méthyl-guanosine sur le premier nucléotide de l'ARNm. La coiffe a plusieurs fonctions, elle est reconnue par un complexe de fixation de la coiffe (CBC ou cap binding complex) qui contribue à l'export de l'ARNm vers le cytoplasme. Elle protège également des dégradations par les exonucléases et permet après le transport de l'ARNm dans le cytoplasme, le recrutement des ribosomes et de la machinerie de traduction.

Figure 25 : Représentation de la coiffe m⁷GTP à l'extrémité 5' de l'ARNm



3) La polyadénylation :

Le pré-ARNm est clivé suite à la reconnaissance d'un site consensus de polyadénylation (AAUAAA). Il y aura ensuite un ajout de 50 à 300 nucléotides au niveau du site de clivage. La

queue poly-A est un enchainement de ribonucléotides de type Adénosine au niveau de l'extrémité 3' de l'ARNm. Elle joue un rôle essentiel dans la stabilité de l'ARNm en empêchant sa dégradation par des exonucléases, le transport de l'ARNm vers le cytoplasme et la traduction. Une fois dans le cytoplasme, la queue poly-A va interagir avec une protéine la PABP (poly(A)-binding-protein).

III- Traduction IRES dépendante

Il existe un autre mode d'initiation de la traduction, indépendant de la coiffe et qui va fait intervenir le recrutement direct des ribosomes à proximité du site d'initiation de la traduction. Les IRES (internal ribosome entry site) viraux ont été les premiers découverts, suivis par l'identification des IRES cellulaires. On estime à environ 10% la proportion d'ARNm pouvant contenir des séquences IRES qui permettraient d'initier la traduction cap-indépendante ¹⁸⁷. Les IRES sont des séquences de tailles variables formant des structures secondaires. Cette traduction est activée dans des situations physiologiques particulières souvent lorsque la traduction cap-dépendante est inhibée. En effet la traduction est un processus énergivore, par conséquent dans des conditions de stress cellulaire, la traduction cap-dépendante est régulée négativement. Cette traduction peut avoir lieu lors d'une infection virale, lors de la mitose ou bien encore lors de l'apoptose ¹⁸⁸. Par exemple lors d'une infection par le poliovirus, le complexe de reconnaissance de la coiffe est inactivé ce qui inhibe la traduction cap-dépendante ¹⁸⁹. La traduction cap dépendante est également réduite au cours de la mitose. En effet une diminution de l'interaction entre le complexe d'initiation de la traduction et la coiffe est observable ¹⁹⁰. La traduction dite IRES prend alors le relais pour assurer la traduction des ARNm. Les séquences IRES permettent un recrutement direct des ribosomes. Un IRES interagit avec le complexe de pré-initiation 43S et scanne l'ARNm jusqu'au niveau du codon d'initiation de la traduction AUG. Certains facteurs d'initiation de la traduction seront également recrutés.

IV- La traduction cap-dépendante

La traduction de l'ARNm est l'étape la plus énergivore de l'expression des gènes et hautement régulée ^{191,192}. Le contrôle de la traduction fournit une réponse rapide aux signaux environnementaux afin d'enclencher la synthèse protéique et de maintenir l'homéostasie

dans la cellule. La traduction chez les eucaryotes comprend trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison ¹⁹³.

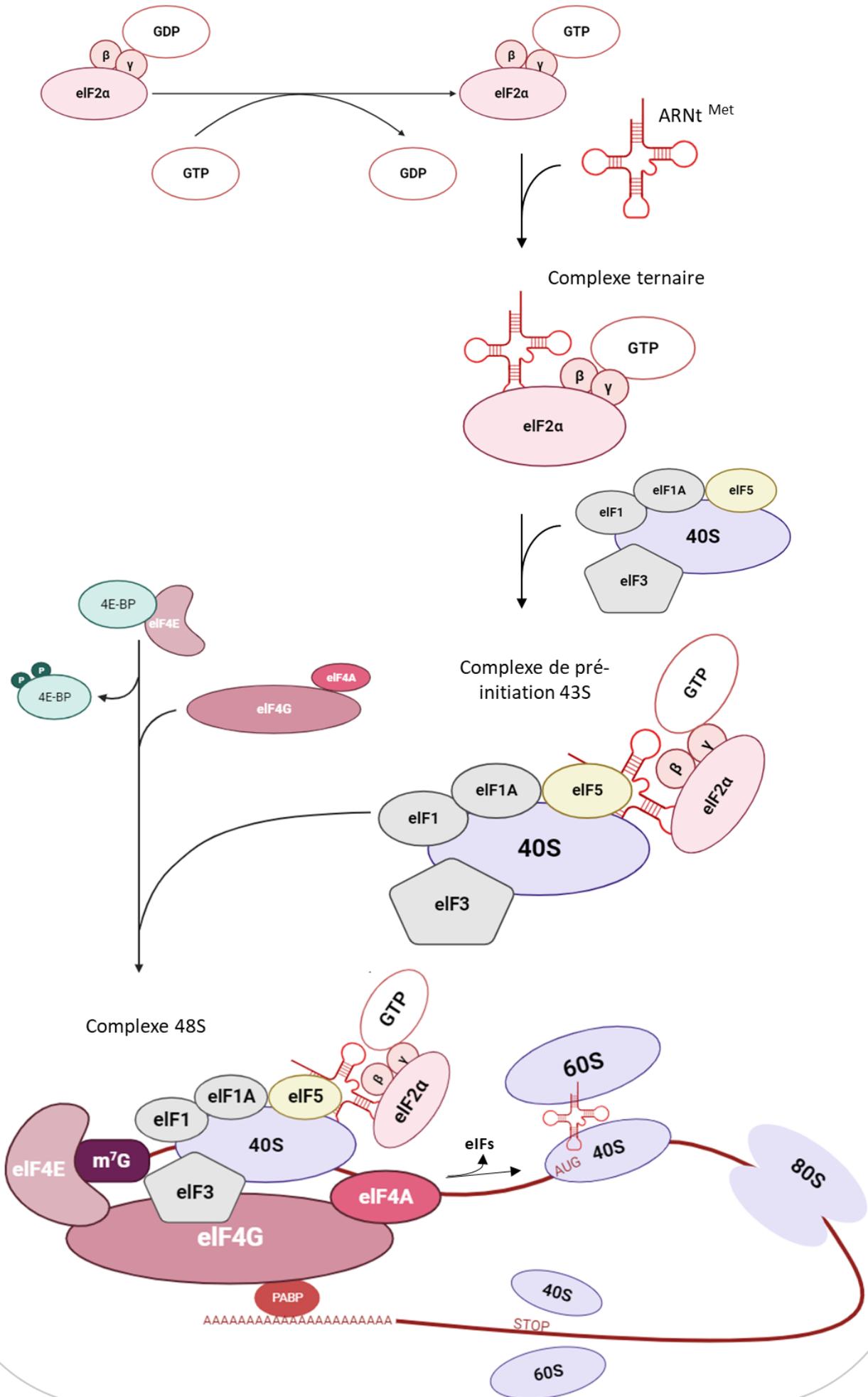
L'initiation de la traduction commence par la fixation du complexe eIF4F (eukaryotic initiation factor 4F) au niveau de la coiffe ¹⁹⁴. Ce complexe se compose de plusieurs protéines eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E), eIF4G (eukaryotic translation initiation factor 4G) et eIF4A (eukaryotic translational initiation factor-4A). La protéine de liaison à la queue poly-A (PABP) s'associe au complexe eIF4F (eukaryotic initiation factor 4F) via la protéine d'échafaudage eIF4G. Cela va induire la circularisation de l'ARNm, ce qui améliore la traduction. La protéine eIF4G interagit aussi avec un eIF3 (eukaryotic initiation factor 3), un complexe multi-protéique responsable du recrutement de la sous-unité ribosomale 40S à l'extrémité 5' de l'ARNm sous la forme d'un complexe de pré-initiation 43S. Ce dernier résulte de l'association de la sous-unité 40S avec un complexe dit ternaire (facteur d'initiation eIF2, ARNti-Met, GTP). Le complexe multi-protéique étant formé, la traduction peut ainsi débiter au niveau du codon d'initiation AUG de la traduction (Figure 26).

L'étape d'élongation de la traduction correspond à la lecture du code génétique, elle identifie pour chaque codon l'acide aminé correspondant. Elle doit maintenir le cadre de lecture afin de ne pas créer de décalage, sélectionner et délivrer les bons acides aminés grâce aux ARNm de transfert (ARNt). Les ribosomes se déplacent de codon en codon le long de l'ARNm, les acides aminés seront ajoutés les uns à la suite des autres par des liaisons peptidiques. Deux facteurs sont essentiels pour l'élongation, il s'agit de eEF1A (eukaryotic elongation factor 1A), qui participe à l'apport des ARNt chargé avec un acide aminé au niveau du ribosome et de eEF2 (eukaryotic elongation factor 2) qui favorise l'avancée du ribosome le long de l'ARNm¹⁹⁵.

La terminaison est la dernière étape de la traduction, elle est médiée par le facteur de libération eRF1, il reconnaît l'un des trois codons d'arrêt (UAA, UAG et UGA). Suite à la reconnaissance du codon stop, le facteur eRF1 (eukaryotic translation termination factor 1) mime un ARNt et se lie au ribosome à la place de ce dernier. Cet événement, ainsi que la liaison de eRF3 (eukaryotic translation termination factor 3) avec le facteur eRF1, stimule l'hydrolyse du GTP et la libération de la chaîne peptidique néosynthétisée ^{196,197}.

Après cette étape de terminaison, les sous-unités ribosomales ainsi que tous les composants de la machinerie de traduction sont recyclés pour participer à un nouveau cycle de traduction.

Figure 26 : Schéma général de la traduction cap-dépendante



1) La formation du complexe de pré-initiation 43S

La première étape de la traduction est la formation du complexe de pré-initiation 43S (PIC). Il résulte de l'association de la sous-unité ribosomale 40S avec un complexe appelé complexe ternaire¹⁹⁸. Le complexe de pré-initiation 43S balaye l'ARNm jusqu'à ce que l'anticodon (ARNti-Met) s'apparie avec le codon initiateur AUG. L'interaction induit l'arrêt du balayage par le complexe PIC, l'hydrolyse du GTP, la dissociation de certains facteurs d'initiation ainsi que la jonction de la sous-unité ribosomale 60S avec la sous-unité 40S. Cela va former un complexe 80S compétant pour entrer dans la phase d'élongation de la synthèse protéique¹⁹².

Complexe ternaire et de pré-initiation 43S

Le complexe ternaire est composé d'ARNt initiateur porteur d'une méthionine (ARNti-Met), du facteur d'initiation eIF2 (eucaryotic translation initiation factor 2) et du GTP¹⁹⁹. Avant la formation du complexe ternaire, le facteur eIF2-GDP est activé en eIF2-GTP par eIF2B. Il se fixe ensuite à l'ARNti-Met afin de former le complexe ternaire. Ce complexe ternaire (eIF2, ARNti-Met, GTP) se lie à la petite sous-unité 40S du ribosome avec, eIF3 (eucaryotic translation initiation factor 3), eIF1 (eucaryotic translation initiation factor 1) et eIF1A (eucaryotic translation initiation factor 1A) pour former le complexe PIC^{200,201}. Les facteurs eIF1 et eIF1A se lient aux sites A et P du ribosome et le complexe eIF3 (composé de 13 sous-unités) va lui interagir avec le facteur eIF4G. Le complexe eIF4F recrute le complexe de pré-initiation 43S au niveau de l'extrémité 5' de l'ARNm grâce à l'interaction entre eIF3 et eIF4G. Cette fixation à l'ARNm va former le complexe 48S. Ce complexe scanne l'ARNm pour trouver le codon d'initiation AUG (Figure 23). Lors de la reconnaissance du codon, l'appariement des bases de l'anti codon (ARNti-met) avec le codon d'initiation se fait au niveau du site P du ribosome. Le premier codon initiateur rencontré est en général celui qui initie la traduction. En effet, pour qu'un codon soit initiateur le contexte nucléotidique qui l'entoure est important et notamment les nucléotides -1 à -6 précédents ce codon, il s'agit d'une séquence consensus appelée séquence de Kozak. Si cette séquence n'est pas présente alors il est possible que le codon initiateur de la synthèse protéique ne soit pas le premier AUG²⁰². La reconnaissance de l'AUG induit l'hydrolyse du GTP qui est liée à eIF2 par les facteurs eIF5 (eucaryotic translation initiation factor 5) et eIF5B (eucaryotic translation initiation factor 5B). La reconnaissance du codon AUG induit le déplacement de eIF1, favorisant un changement de conformation d'eIF2 permettant la libération du phosphate lors de l'hydrolyse du GTP. Cela induit la dissociation

du complexe 48S et permet la liaison de la sous-unité 40S avec la sous-unité 60S afin de former l'unité ribosomale 80S. La formation du ribosome 80S donne le point de départ de l'étape d'élongation. Les constituants du complexe pourront être recyclés pour un prochain cycle de traduction ²⁰³.

Le facteur eIF2 :

Le facteur eIF2 est composé de trois sous-unités, α , β et γ . La sous-unité γ possède une activité GTPasique et contient le site de liaison au GTP et à l'ARNti-Met. Lorsque eIF2 est en complexe avec du GDP, il est sous sa forme stable et inactive ²⁰⁴. L'échange du GDP par du GTP est possible grâce au facteur eIF2B qui possède une activité GEF (Guanosine Exchange Factor). Cet échange est nécessaire pour la formation du complexe ternaire. L'ARNti-Met a une affinité plus élevée pour eIF2 quand il est lié au GTP plutôt qu'au GDP. Lors de la fin du cycle, eIF2 reprend sa forme inactive par l'hydrolyse du GTP en GDP. Cela entraîne un changement de conformation d'eIF2 et une perte d'affinité pour l'ARNti-Met. Le décrochage de ce facteur permettra le recyclage d'eIF2.

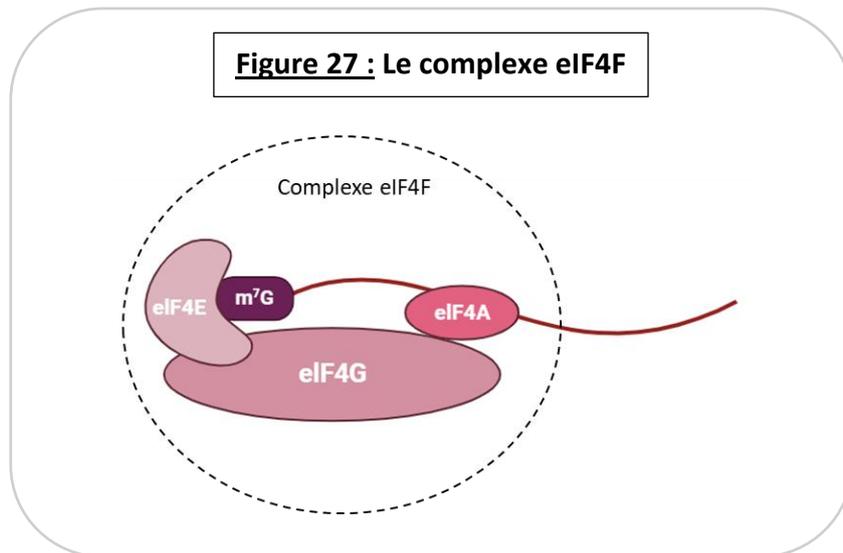
La sous-unité α est la sous-unité régulatrice d'eIF2. Cette sous-unité est phosphorylable sur la sérine 51 par plusieurs kinases. En condition de stress, la phosphorylation d'eIF2 α inhibe l'activité de d'eIF2B en empêchant l'hydrolyse du GTP en GDP. Cela impose un contrôle négatif de l'initiation de la traduction et met un frein à la synthèse protéique ²⁰⁵.

2) Le complexe d'initiation de la traduction

Le complexe eIF4F :

Le processus commence par la reconnaissance de la coiffe m⁷GTP de l'ARNm par le complexe du facteur d'initiation de la traduction 4F (eIF4F) ^{206,207}. Cela facilite le recrutement de la petite sous-unité ribosomale 40S au niveau de l'ARNm. Le complexe eIF4F (Figure 27) est composé de trois protéines : eIF4E, eIF4G et eIF4A. Chaque protéine joue un rôle précis et essentiel dans la régulation de l'initiation de la traduction. La surface concave du facteur d'initiation de la traduction 4E (eIF4E) se lie à la coiffe ²⁰⁸ et sa surface convexe interagit avec eIF4G, une protéine d'échafaudage. Cette dernière recrute eIF4A, une ARN hélicase ATP dépendante qui dénature les structures secondaires de l'ARNm. L'abondance de ces facteurs et notamment eIF4E régule l'initiation de la traduction.

Figure 27 : Le complexe eIF4F



eIF4G :

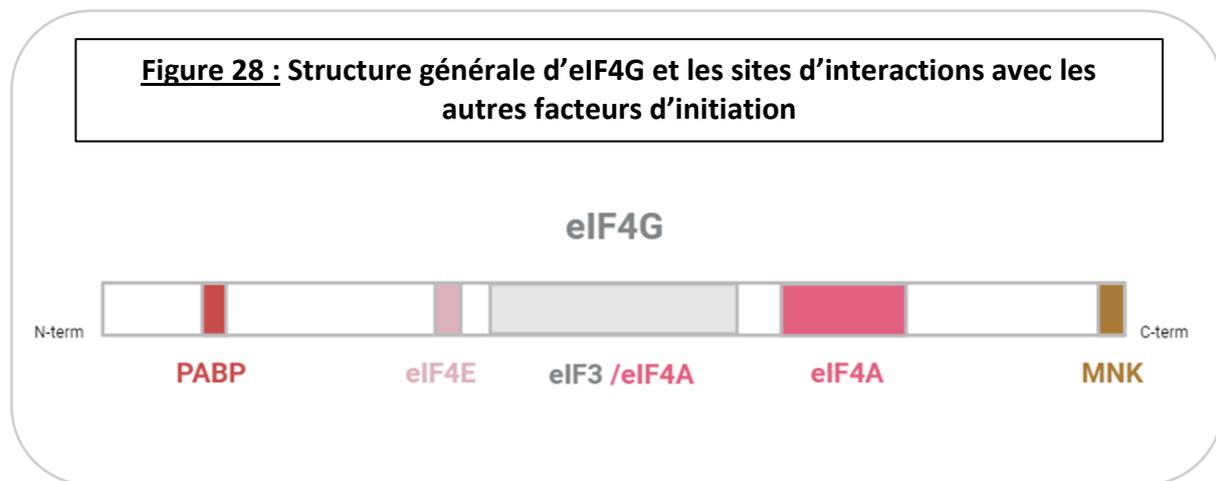
Le facteur eIF4G est une protéine d'échafaudage qui présente plusieurs sites de fixation pour l'ARNm mais également de nombreuses protéines impliquées dans l'initiation de la traduction. Ce facteur possède des domaines de liaison à l'ARNm (2 dans son domaine central) et également à différents facteurs de la machinerie de la traduction. Il interagit également avec la kinase MNK.

Le complexe eIF3 interagit avec le domaine central de la protéine eIF4G, alors que eIF4E et PABP (Poly(A) Binding Protein) se lient au domaine N-terminal de la protéine. eIF4G présente deux domaines de liaison (central et C-terminal) pour eIF4A²⁰⁹. Le domaine C-terminal permet également l'interaction avec la kinase MNK²¹⁰ (Figure 28).

L'interaction entre eIF4G et eIF4E implique un motif conservé sur eIF4G formé par la séquence consensus suivante : Tyr-X-X-X-X-Leu- ϕ (X est variable et ϕ est un acide aminé hydrophobe). eIF4G lie eIF4E sur sa face convexe, à l'opposé du site de liaison à la coiffe. Il est démontré que cette interaction augmente fortement la liaison de eIF4E pour la coiffe²¹¹.

Ce facteur permet la circularisation de l'ARNm par sa liaison avec PABP permettant de rapprocher l'extrémité 3' de la 5'. La circularisation des ARNm est essentielle pour la traduction²¹². La PABP interagit avec des acteurs du complexe d'initiation de la traduction, ce qui va circulariser l'ARNm et potentialiser sa traduction²¹³. La liaison de la PABP avec un autre facteur eIF4G permet la circularisation de l'ARNm, cette liaison entre ces deux facteurs permet de rapprocher l'extrémité 3' de l'ARNm à la 5'²¹⁴. La circularisation des ARNm est essentielle

pour la traduction mais également pour le recyclage des ribosomes de la région 3' du codon stop vers la région 5' de l'ARNm ²¹⁵.



eIF4A :

Le facteur eIF4A est une ARN hélicase appartenant à la famille des hélicases à ARN DEAD-box parmi les mieux caractérisés ²¹⁶. C'est le facteur d'initiation le plus abondant chez les mammifères. C'est une enzyme qui déroule les structures secondaires de l'ARNm par un mécanisme dépendant de l'ATP ²¹⁷. Cela permet de faciliter le recrutement du complexe de pré-initiation 43S (PIC) au niveau de l'ARNm à proximité de la coiffe ainsi que l'élongation de l'ARNm ²¹⁸. À elle seule, l'activité hélicase est faible et non processive mais son activité est stimulée par la liaison à deux cofacteurs eIF4B et eIF4H et agit alors comme une hélicase processive ^{219,220}.

3) Le facteur d'initiation de la traduction eIF4E

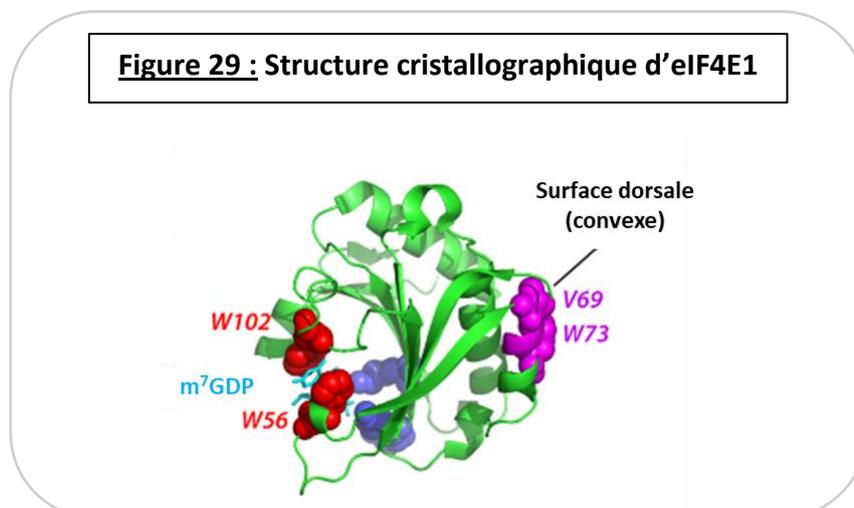
Le facteur d'initiation de la traduction (eIF4E) est un élément central de l'initiation de la traduction dans les cellules eucaryotes. De par son interaction avec la coiffe des ARNm, il permet le recrutement de toute la machinerie nécessaire à l'étape d'initiation de la traduction. Des études ont permis d'identifier et de caractériser trois membres différents de la famille d'eIF4E appelés eIF4E1, eIF4E2 et eIF4E3 ^{221,222}. La structure d'eIF4E a été hautement conservée au cours de l'évolution chez les eucaryotes. Ces trois homologues possèdent une grande identité au niveau de leur région centrale de la liaison à la coiffe.

a) Le facteur d'initiation eIF4E1

Généralités et fonctions du facteur eIF4E1

Le facteur eIF4E1 est une protéine cytoplasmique qui présente une structure particulière avec une face concave et l'autre convexe. Cette protéine de liaison à la coiffe est la mieux caractérisée par rapport à ses deux homologues. eIF4E1 joue un rôle central dans la traduction et dans l'expression des gènes. Mais il est considéré comme le facteur le moins abondant et donc limitant pour la liaison des ribosomes à l'ARNm ²²³. Ce facteur est donc la cible de nombreuses régulations. Il est contrôlé par des voies de signalisation responsables de sa phosphorylation par exemple, ou encore son gène est la cible de facteurs de transcription comme c-myc ²²⁴. Le facteur eIF4E1 est impliqué dans la traduction d'ARNm régulant de nombreuses fonctions biologiques comme la prolifération (cycline D1), la croissance, la survie cellulaire. L'initiation de la traduction est un processus finement régulé qui peut en cas de dysfonctionnement conduire au développement de cancers.

L'initiation de la traduction commence par la formation du complexe eIF4F et plus précisément par la fixation d'eIF4E1 au niveau de la coiffe des ARNm (Figure 29). La fixation du facteur d'initiation eIF4E1 sur la coiffe résulte d'un processus électrostatique reposant sur la charge positive de la coiffe et sur le nuage d'électrons négatifs des résidus aromatiques (π) présents sur protéine liant la coiffe. Le facteur eIF4E1 possède deux résidus aromatiques tryptophanes (Trp 56 et Trp 102) situés dans la face concave de la protéine ²²⁵. Un troisième tryptophane (Trp 166) sur la protéine eIF4E1 reconnaît, grâce à des liaisons hydrogènes, le résidu N7-méthylé de la coiffe. Par ces interactions la coiffe est prise en « sandwich » dans la face concave de la protéine eIF4E1 ^{208,221}.



Régulation d'eIF4E1 par sa phosphorylation

Le facteur eIF4E1 est phosphorylé sur la serine 209²²⁶, par la kinase MNK. Il a été mis en évidence que cette phosphorylation augmente l'affinité de liaison de ce facteur pour la coiffe²²⁷ et participe donc à l'efficacité de la traduction. La kinase MNK est une sérine/thréonine kinase qui ne se lie pas directement à eIF4E1. En effet MNK est recruté via le domaine C-terminal du facteur eIF4G^{210,228}. Pour rappel eIF4E1 interagit avec eIF4G grâce à sa face dorsale convexe. Le facteur eIF4E1 a sur sa face dorsale une partie hydrophobe où se trouve le site de reconnaissance des facteurs eIF4G et 4E-BP. Ce site de reconnaissance est une séquence conservée du consensus (S/T) VXXFW, qui est similaire à celle des facteurs eIF4G et 4E-BP²²⁹. Il a également été montré que certains acides aminés (His37, Pro38, Gln40, Val69, Trp73, Leu131, Glu132 et Leu135) participent à la liaison avec eIF4G et 4E-BP et jouent le rôle de point d'ancrage, dont parmi eux deux acides aminés appartenant à la séquence du consensus (Val69 et Trp73). En effet une inhibition de la liaison entre eIF4E1 et eIF4G diminue la phosphorylation d'eIF4E1. L'interaction entre les deux facteurs permet le rapprochement entre la kinase MNK et le facteur eIF4E1, ce qui suggère que eIF4E1 est phosphorylé uniquement quand il appartient au complexe eIF4F.

Il existe cependant des études controversées concernant le rôle de la phosphorylation d'eIF4E1. En effet des expérimentations ont révélé que la phosphorylation d'eIF4E1 diminuerait l'affinité pour l'ARNm²³⁰. Les premières données suggèrent que la phosphorylation de la sérine 209 permet la formation d'un pont salin avec la lysine 159 qui fixe le facteur eIF4E1 sur la coiffe et augmente donc son affinité avec l'ARNm. Or d'autres études suggèrent que la ser209 et la lys159 sont trop loin pour former une telle structure et que au contraire, la phosphorylation diminuerait l'affinité. Une étude a comparé l'efficacité de la synthèse protéique entre une protéine eIF4E1 sauvage phosphorylable et une protéine mutée sur la ser209 non phosphorylable. Ces données montrent qu'il n'y a pas de différence dans la synthèse protéique²³¹. Malgré ces divergences, la communauté scientifique s'accorde sur le fait qu'une traduction exacerbée, dépendante d'eIF4E1 et de sa phosphorylation, est associée au développement oncogénique.

Régulation négative d'eIF4E1 :

L'activité d'eIF4E1 est régulée par des protéines de liaison à eIF4E1 appelées 4E-BP (eIF4E-Binding Proteins). Il existe trois isoformes 4E-BP1, 4E-BP2 et 4E-BP3 ²³²⁻²³⁴. Le facteur 4E-BP contient une séquence consensus Tyr-XXXX-Leu-Φ, (où Φ est n'importe quel acide aminé hydrophobe) qui permet la liaison avec eIF4E1. Les facteurs eIF4G et 4E-BP sont en compétition pour se fixer au niveau d'un même site de liaison sur le dos convexe d'eIF4E1 ²³³. Ces deux protéines conservent un même site de reconnaissance pour eIF4E1. Les trois protéines sont capables d'interagir avec eIF4E1 et d'inhiber sa fonction. L'interaction de 4E-BP avec eIF4E1 dépend de l'état de phosphorylation de 4E-BP ²³⁵. En effet 4E-BP1 possède 7 sites de phosphorylation, alors que 4E-BP2/3 en ont que 5. La phosphorylation est sous la dépendance de voies de signalisations dépendante de kinases. La phosphorylation de 4E-BP réduit considérablement son affinité pour eIF4E1. Lorsque 4E-BP est hypophosphorylé, il séquestre eIF4E1, l'empêchant d'interagir avec eIF4G et bloquant ainsi la formation du complexe eIF4F. Cela aura pour conséquence un blocage de la traduction cap-dépendante. La fonction et l'expression des différents membres de la famille 4E-BP indiquent qu'il existe une redondance dans ce mécanisme de contrôle de la traduction, soulignant son importance.

Régulation d'eIF4E1 par les voies de signalisation

La régulation du complexe d'initiation de la traduction et des différents facteurs est sous la dépendance de plusieurs voies de signalisation comme la voie PI3K/ Akt / mTor (Phosphatidyl Inositol 3-Kinase-Akt-Mammalian target of rapamycin) et la voie des MAPK (Mitogen-activated protein kinases) ²³⁶. L'activation de ces voies par des mitogènes ou des facteurs de croissance entraîne une cascade de phosphorylations successives de différents facteurs aboutissant à la traduction de gènes impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire. Le contrôle de ces voies de signalisation est essentiel pour maintenir l'homéostasie cellulaire ²³⁷.

La voie PI3K/ Akt

La voie PI3K/mTOR (Phosphatidyl Inositol 3-Kinase-Akt-Mammalian target of rapamycin) intègre des signaux extra et intracellulaires pour contrôler la traduction en régulant l'association d'eIF4E1 avec ses partenaires inhibiteurs (4E-BP)(Figure 30). En effet la disponibilité d'eIF4E1 et la formation du complexe de traduction dépend du facteur eIF4E-Binding Proteins (4E-BP 1/2) ²³⁸. En effet ce dernier présente une forte affinité de liaison pour

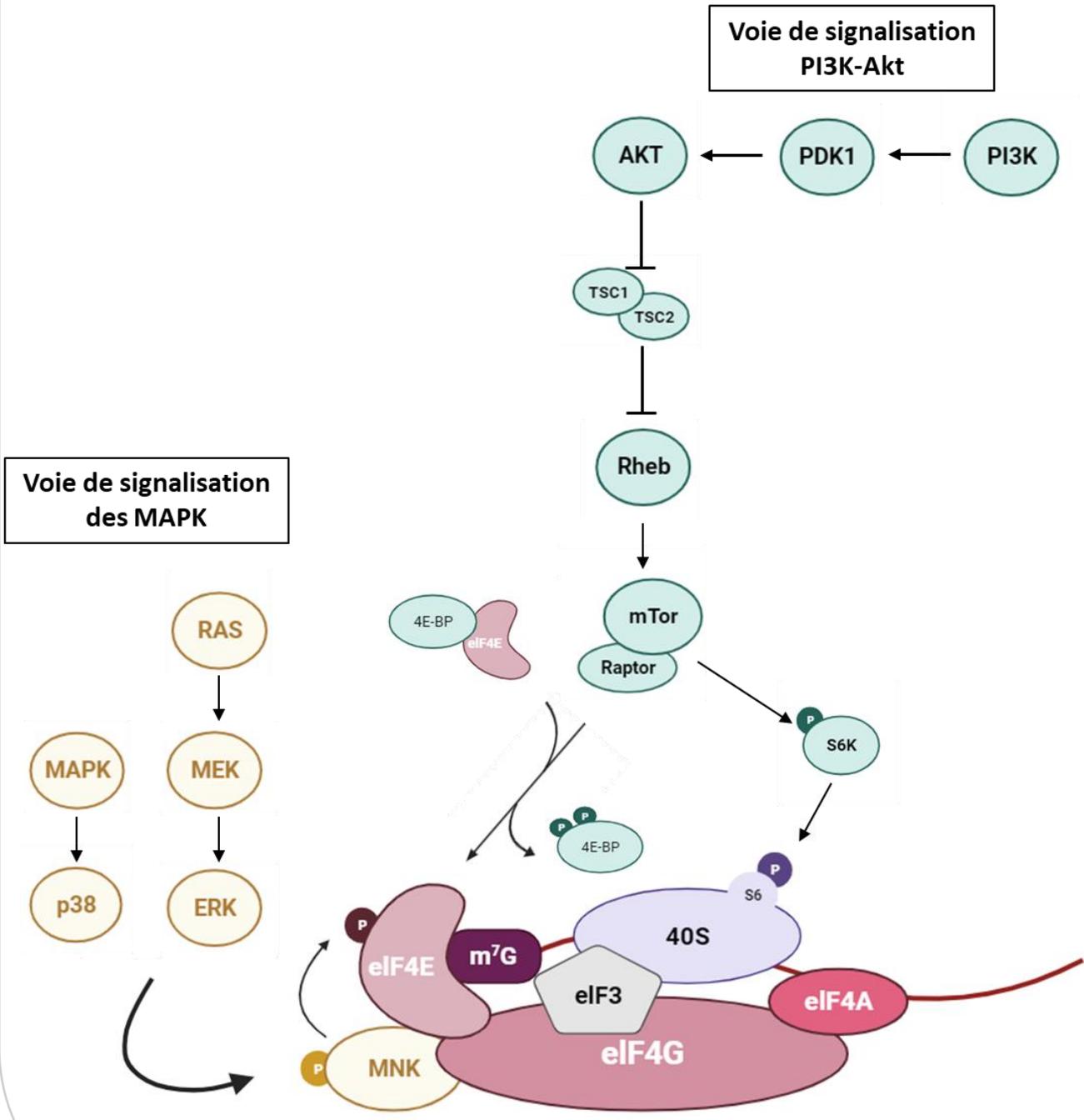
eIF4E1 sous sa forme déphosphorylée. L'activation de la voie de signalisation **PI3K-Akt** conduit à la phosphorylation d'4E-BP1/2 par la kinase mTOR. Cette phosphorylation libère le facteur eIF4E1, qui peut ainsi interagir avec eIF4G. Lorsque 4E-BP est hypophosphorylé il bloque l'assemblage du complexe eIF4F, il est en concurrence avec eIF4G pour un site de liaison commun sur eIF4E. La formation du complexe eIF4F active la traduction cap-dépendante ²³⁵.

L'activation de la voie PI3K conduit à l'activation de PDK1 puis de Akt (3 isoformes existent : AKT1, AKT2 et AKT3). La protéine Akt à son tour phosphoryle les facteurs TSC1/2 pour empêcher leurs dimérisations. Cela inhibe la Rheb GTPase et par conséquent permet l'activation de mTORC1 (association de mTOR et de Raptor). Le complexe mTORC1 phosphoryle à son tour la kinase p70-S6K et le facteur 4E-BP²³⁹. La kinase p70-S6K ou S6K1 est une cible en aval de la signalisation mTORC1, qui phosphoryle la protéine S6 (composant de la sous-unité 40S) ainsi que d'autres facteurs comme eIF4B. L'activation de cette voie est sous le contrôle de la phosphatase PTEN (Phosphatase and TENSin homolog) qui permet d'éviter une suractivation de la signalisation dépendante de PI3k.

La voie des MAPK

La voie de signalisation des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) régule les kinases MNK1/2 lesquelles phosphorylent eIF4E1 sur la sérine 209 ²⁴⁰ (Figure 30). Les kinases MNK1 et MNK2 sont des sérines/thréonines protéines kinases qui sont elles-mêmes activées par une cascade de signalisations dépendantes des kinases RAS/MEK/ ERK et p38. MNK1 est le principal acteur de la phosphorylation de eIF4E1 dans la cellule, alors que MNK2 phosphoryle eIF4E1 mais dans une moindre mesure car la régulation de MNK2 ne dépend pas de p38 ²⁴¹. Une fois activées, les kinases MNK sont recrutées au niveau du complexe eIF4F par l'intermédiaire d'eIF4G et phosphorylent ainsi le facteur eIF4E1.

Figure 30 : La régulation du complexe d'initiation de la traduction eIF4F par les voies de signalisation des MAPK et de PI3K-Akt



Les fonctions nucléaires d'eIF4E1 :

Les facteurs d'initiation de la traduction sont classiquement retrouvés dans le cytoplasme et contrôlent la synthèse protéique. Un nombre croissant d'études ont démontré qu'eIF4E1 avait une autre localisation dans la cellule. Il se retrouve également dans des structures nucléaires appelées corps nucléaires d'où il favorise le transport d'ARNm sélectifs vers le cytoplasme. Cela a pu être mis en évidence grâce à des expériences d'immunofluorescence où il a été démontré qu'une fraction de ce facteur se trouve dans le noyau^{242,243}. Il favorise le transport d'ARNm régulant la croissance cellulaire comme la cycline D1.

b) Le facteur d'initiation eIF4E2

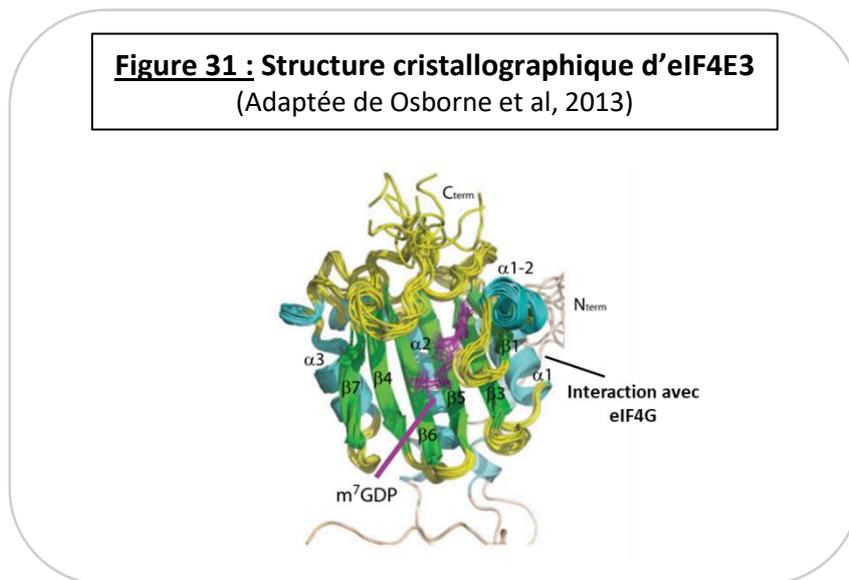
eIF4E2 (4E-LP ou 4EHP auparavant) est une protéine homologue à eIF4E1 qui partage environ 28% d'identité avec son homologue eIF4E1²⁴⁴. Elle est également 5 à 10 fois moins abondante que eIF4E1. eIF4E2 présente une substitution au niveau du Trp 56 chez eIF4E1. Ce tryptophane est remplacé par une tyrosine (Tyr), cependant cela n'empêche pas la fixation de ce facteur à la coiffe de l'ARNm. Ces modifications sont à l'origine d'une moins bonne affinité de liaison pour la coiffe. eIF4E2 n'interagit pas avec eIF4G en revanche il est capable de se lier aux trois formes de 4E-BP mais se lie préférentiellement à 4E-BP2 et 4E-BP3. Ce facteur est également décrit comme étant essentiel au développement périnatal, un KO pour ce gène est létal au cours du développement. En effet ce facteur est impliqué dans la traduction d'un sous-groupe d'ARNm au cours du développement embryonnaire²⁴⁵. Il est également recruté en condition de stress hypoxique dans un complexe particulier dépendant du facteur HIF-2 α (Hypoxia inducible factor 2) se fixant à la coiffe afin de traduire des ARNm cibles particuliers permettant de faire face à ce stress²⁴⁶.

c) Le facteur d'initiation eIF4E3 :

Généralités du facteur eIF4E3

Peu d'études se sont concentrées sur le facteur d'initiation eIF4E3, il possède donc de nombreuses zones d'ombre. Présentant 25% d'homologie structurelle et 50% de similarité, eIF4E1 et eIF4E3 semblent pourtant posséder des rôles distincts au sein de la cellule²²¹. En effet les premières études sur ce facteur ont mis en évidence la fixation atypique d'eIF4E3 au niveau de la coiffe (mGTP). Des études utilisant une approche biophysique ont permis de mettre en évidence ce mode de fixation différent. Un des deux tryptophanes d'eIF4E1 (Trp56)

est remplacé par un acide aminé non aromatique, la cystéine 52. La reconnaissance de la coiffe se fait grâce à la combinaison de la Cys52 et du Trp98 (Figure 31). Cependant on retrouve l'équivalent du résidu Trp166 d'eIF4E1 au niveau d'eIF4E3, permettant l'interaction avec le résidu N7-méthylé de la coiffe grâce à des interactions de van der Waals. Le facteur eIF4E3 utilise une stratégie inhabituelle mais il se lie tout de même spécifiquement au niveau de la coiffe des ARNm. eIF4E3 rentre donc en compétition avec eIF4E1 pour la fixation à la coiffe. Cependant la fixation d'eIF4E3 au niveau de la coiffe est entre 10 à 40 fois moins efficace que celle d'eIF4E1²⁴⁷.



Les premières analyses ont également montré qu'eIF4E3 ne peut interagir avec aucune des trois formes du facteur 4E-BP empêchant ainsi la régulation par les 4E-BPs. A l'inverse d'eIF4E2, le facteur eIF4E3 interagit avec le facteur eIF4G, mais avec une moins bonne affinité qu'eIF4E1. Cela peut donner lieu à une compétition entre eIF4E3 et eIF4E1 pour la fixation à eIF4G. Cependant l'interaction avec eIF4G suggère l'implication d'eIF4E3 dans la traduction cap-dépendante et la synthèse protéique. Mais les fonctions biologiques d'eIF4E3 ainsi que sa régulation ne sont pas connues. Fait intéressant, le site de phosphorylation présent sur eIF4E1 (ser209) n'est pas conservé, suggérant qu'eIF4E3 échappe aussi à la régulation par la kinase MNK.

La localisation d'eIF4E3 a été étudiée : une localisation nucléaire et cytosolique a été mise en évidence comme pour son homologue eIF4E1. Cela suggère que ce facteur peut donc jouer un rôle à la fois dans l'exportation et la traduction de l'ARNm.

Afin d'en apprendre un peu plus sur la régulation de ce facteur, l'expression d'eIF4E3 a été regardée dans plusieurs tissus. En effet l'expression endogène d'eIF4E3 diffère au sein des tissus, par exemple elle est absente dans les fibroblastes mais présente au sein de cellules hématopoïétiques. L'expression d'eIF4E3 semble être donc tissu dépendante ²⁴⁷.

Les fonctions du facteur eIF4E3

Actuellement peu de travaux reflètent le rôle du facteur d'initiation eIF4E3. Son mode de fonctionnement ainsi que sa fonction biologique restent encore peu connus. Pour autant, de nouvelles recherches s'intéressent à ce facteur. D'ailleurs chez la drosophile, le rôle d'eIF4E3 a été démontré comme étant essentiel pour la spermatogenèse et notamment pour la méiose des spermatozoïdes. En effet les mâles dépourvus de ce facteur sont stériles. Ce facteur forme également le complexe eIF4F et interagit avec les facteurs eIF4G ²⁴⁸. Cet exemple suggère qu'eIF4E3 contrôle une traduction spécifique de certains gènes chez la drosophile.

Une autre étude a observé la fonction du facteur eIF4E3 en condition de stress ²⁴⁹. Pour induire ce stress, un inhibiteur de mTor ou de la PI3K a été utilisé. Pour rappel la voie de signalisation PI3K/Akt permet la phosphorylation du facteur 4E-BP via mTor. Lorsque cette voie est inhibée, eIF4E1 est alors séquestré par 4E-BP1. Cette étude a mis en évidence que lors d'un stress, c'est eIF4E3 qui forme un complexe eIF4F actif. Dans des conditions de prolifération normale, la traduction est plutôt dépendante du facteur eIF4E1. Lors d'un stress (ici induit par des inhibiteurs), eIF4E3 remplace le facteur eIF4E1 dans le complexe eIF4F, lorsque ce dernier est séquestré par 4EBP1 hypophosphorylé.

Ces premières études ont permis de caractériser le facteur d'initiation eIF4E3 en démontrant ses capacités de fixation à la coiffe et au facteur eIF4G. Cependant ce dernier semble échapper à la régulation directe par les voies de signalisation des MAPK/MNK ou la voie PI3K/Akt-mTOR. À ce jour nous ne connaissons pas les mécanismes de régulation ce facteur, ni les ARNm dont la traduction pourrait être spécifique d'eIF4E3. Mais il semblerait que la traduction dépendante de ce facteur soit initiée dans des conditions précises et ne participe pas à la traduction globale comme son homologue eIF4E1.

Pour résumer :

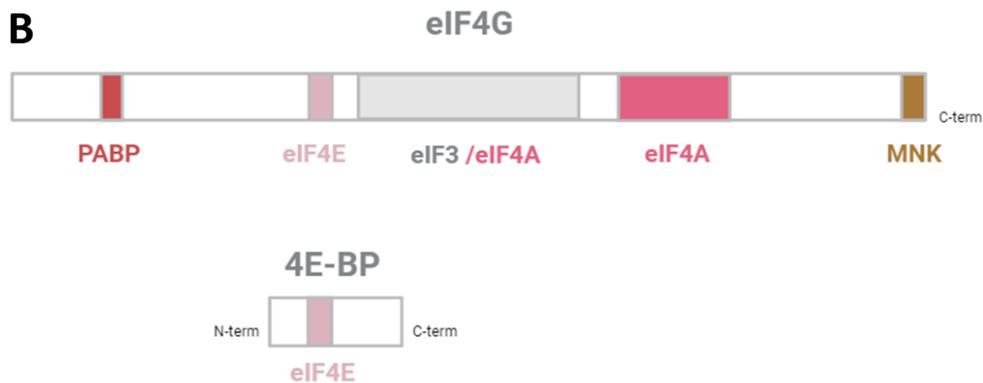
Ces trois facteurs ont donc une capacité de se fixer à la coiffe avec une plus ou moins grande affinité mais ne peuvent subir les mêmes régulations, du fait de leurs absences de liaison avec certains facteurs. De plus, des études sur les trois homologues ont permis de montrer la distribution tissulaire de ces facteurs. Les facteurs eIF4E1 et eIF4E2 sont exprimés de manière omniprésente dans de nombreux tissus avec un niveau plus élevé dans les gonades. Alors que le facteur eIF4E3 est retrouvé essentiellement dans le cœur, les muscles squelettiques, les poumons et la rate ²²¹. Une telle distribution (homogène) suggère que ces facteurs sont des régulateurs globaux de la traduction, à l'inverse on peut supposer qu'eIF4E3 contrôle une traduction plus spécifique. Cependant eIF4E2 lie la coiffe mais ne peut fixer à eIF4G, il est donc peu probable que ce facteur participe à la traduction cap-dépendante (Figure 32). eIF4E-2 et eIF4E-3 contiennent tous deux le même motif (S/T) VXXFW (résidus 68 à 73) qu'eIF4E-1, le résidu Trp est requis pour l'interaction avec les facteurs eIF4G et 4E-BP. D'autres résidus qui entrent en contact avec eIF4G et 4E-BP dans eIF4E-1 sont conservés à la fois dans eIF4E-2 et eIF4E-3 à quelques exceptions près. Les résidus d'eIF4E1 (His37, Gln40, Leu131) permettant l'interaction avec eIF4G sont remplacés par des résidus Val30, His33 et Lys123 respectivement pour eIF4E3. De plus, eIF4E2 possède tous les résidus nécessaires à l'interaction avec eIF4G à l'exception de la Leu131 et de la Glu132 qui sont remplacées par des résidus Glu et Asn. Or la Leu131 est également substituée pour le facteur eIF4E3, qui lui peut se lier au facteur eIF4G. De plus eIF4E2 peut se fixer à 4E-BP, par la liaison d'eIF4E2 avec 4E-BP, ce complexe pourrait réguler la traduction, en empêchant 4E-BP de se lier à eIF4E1. Il semblerait donc que ce soit l'enchaînement des résidus dans un ordre bien précis qui conditionne l'interaction de ces facteurs avec eIF4G et/ou 4E-BP ²⁵⁰. L'interaction d'eIF4E3 avec la coiffe ainsi qu'avec le facteur eIF4G suggère que ce facteur peut jouer le rôle de facteur d'initiation dans la traduction cap-dépendante.

Figure 32 : Les différentes interactions des facteurs d'initiation de la traduction

(A) Interaction des facteurs d'initiation de la traduction, (B) Structure générale d'eIF4G et 4E-BP et interactions avec les autres facteurs d'initiation, (C) Séquence des membres de la famille eIF4E et leurs interactions avec la coiffe et les autres facteurs d'initiation (Adaptée de Osborne et al, 2013).

A

Affinité / Interaction	eIF4E1	eIF4E2	eIF4E3
m ⁷ GTP	Forte	Faible	Faible
eIF4G	Oui	Non	Oui
4E-BP	Oui	Oui	Non
MNK (phosphorylation)	Oui	Non	Non



Légende

□ Résidus essentiels pour la reconnaissance de la coiffe

□ Séquence consensus de reconnaissance à eIF4G ou 4E-BP

□ Points d'ancrage supplémentaires participant à la reconnaissance de la coiffe

4) Traduction et cancer

L'implication d'eIF4E1 dans le cancer

La dérégulation de la traduction et des facteurs d'initiation est associée à un large éventail de cancer ^{251,252}. La traduction est un processus contrôlé par une grande variété de facteurs extracellulaires et intracellulaires. Ces dérégulations engendrent une prolifération et une croissance cellulaire exacerbée ²⁵³. L'activité accrue du complexe d'initiation de la traduction aura pour conséquence une synthèse protéique dérégulée qui participe à l'oncogenèse ²⁵⁴.

La première preuve que la dérégulation de la traduction des ARNm est impliquée dans le développement d'un cancer remonte à 1896. La surexpression des différents acteurs impliqués dans le contrôle traductionnel est omniprésente chez les patients atteints de cancer. De nombreuses mutations liées au cancer se trouvent dans les voies qui alimentent la machinerie de la traduction. On retrouve de nombreuses mutations d'oncogènes comme Myc, Ras ou des mutations de suppresseurs de tumeur comme TP53 ou bien PTEN. La surexpression des facteurs d'initiation de la traduction comme par exemple eIF4E1, eIF4G ou eIF4A est retrouvée dans de nombreux cancers ²⁵⁵.

Outre ces dérégulations qui favorisent l'oncogenèse, la structure des ARNm joue un rôle essentiel dans le processus de traduction. Le facteur eIF4E1 est le facteur d'initiation le moins abondant, les ARNm sont donc « en compétition » pour des quantités limitées de ce facteur. Il est décrit que la surexpression d'eIF4E1 améliore la traduction des ARNm avec un long 5'UTR ²⁵⁶. Ces ARNm longs ont de nombreuses structures secondaires qui nécessitent l'activité de l'ARN hélicase (eIF4A) et donc l'assemblage du complexe eIF4F au niveau de la coiffe ²⁵⁷. La traduction de ces ARNm est donc stimulée par la disponibilité et la phosphorylation d'eIF4E1. Cependant les ARNm avec un long et structurés 5'UTR codent généralement pour des protéines impliquées dans la survie, la prolifération et la croissance cellulaire. Différentes dérégulations sont à l'origine d'une augmentation de la disponibilité et de la phosphorylation d'eIF4E1. Cela stimule la traduction d'ARNm spécifiques (5' UTR long), contribue à la prolifération et à la survie cellulaire exacerbée, et favorise l'oncogenèse ²⁵⁸.

Dérégulation des voies de signalisation

La traduction est contrôlée par des voies de signalisation qui détectent divers stimuli comme un stress (UV), les hormones ou facteurs de croissance ou la disponibilité en nutriments ou en

acides aminés ²⁵⁹ . La dérégulation des voies de signalisation est un phénomène courant à l'origine du développement des cancers ²⁵⁵ L'activation exacerbée de la voie PI3K-Akt a pour conséquence une hyper phosphorylation du facteur 4E-BP. Sa capacité à inhiber la traduction en séquestrant eIF4E1 est alors altérée. Il en résulte une suractivation du complexe d'initiation de la traduction et par conséquent de la synthèse protéique favorisant la croissance et la prolifération cellulaire tumorale ²³⁵. Des mutations de protéines impliquées dans la signalisation des MAPK comme Ras ²⁶⁰ ont pour conséquences une hyperactivation de la kinase MNK et donc une hyper phosphorylation d'eIF4E1. La dérégulation de ces voies de signalisation à différents niveaux compromet l'homéostasie cellulaire et favorise la tumorigenèse ²⁶¹.

Dérégulation de facteurs de transcription

L'expression accrue de facteurs de transcription peut également être à l'origine du développement de cancers. En effet par leur capacité à réguler l'expression des gènes, leur dérégulation peut conduire à la transcription exacerbée des gènes cibles. Le facteur d'initiation de la traduction eIF4E1 est surexprimé dans de nombreux cancers (environ 30% des cancers) et également dans les LAM ²⁶².

Nous pouvons donner pour exemple le facteur de transcription myc muté dans de nombreux cancers y compris dans les LAM. Les membres de la famille de c-myc se lient à l'ADN, au niveau de séquences E-box et modulent l'expression transcriptionnelle de gènes jouant un rôle dans la croissance et la prolifération cellulaire. Le facteur de transcription c-myc est induit par des mitogènes et régule de nombreux processus cellulaires. Des altérations de c-myc conduisent à une expression dérégulée contribuant à la tumorigenèse. Différents facteurs d'initiation de la traduction comme eIF4E, eIF4G, eIF4A ou encore eIF4B ont été identifiés comme des cibles de c-myc ²⁶³. Par exemple, eIF4E est une cible bien caractérisée de c-Myc, et la transactivation est médiée par la présence de deux motifs E-box dans le promoteur eIF4E ²²⁴. Les niveaux d'eIF4F augmentent lors de l'activation de c-myc (par des mitogènes), il a également été montré que le complexe eIF4F régule à son tour positivement l'expression de c-myc. Cela suggère une boucle de rétroaction entre c-myc et eIF4F qui participe au développement de cancers quand cette dernière est dérégulée ²⁶⁴ .

Un autre facteur de transcription NF- κ B est impliqué dans la régulation de l'expression d'eIF4E1. L'activation constitutive de ce facteur a notamment été montrée chez les patients atteints de LAM ²⁶⁵. Ce facteur joue un rôle central dans la régulation de croissance ou de la prolifération et il a été montré que ce facteur régulait de manière aberrante eIF4E1 dans les LAM. Le facteur eIF4E1 est une cible transcriptionnelle directe de NF- κ B notamment dans les cellules hématopoïétiques. Chez les patients atteints de LAM, NF- κ B s'associe beaucoup plus au promoteur d'eIF4E1 par rapport à des donneurs sains ²⁶⁶. Ces découvertes mettent en évidence les dérégulations de la machinerie de la traduction qui conduisent à la tumorigenèse.

Rôle nucléaire d'eIF4E1 dans le cancer

La surexpression de facteurs d'initiation de la traduction peut déréguler la fonction nucléaire de facteurs comme eIF4E1. La surexpression d'eIF4E1 induit la dérégulation du transport des ARNm du noyau vers le cytoplasme et serait impliquée dans la leucémogénèse²⁶². La fraction nucléaire d'eIF4E1 assure le transport d'un sous-ensemble de transcrits comme par exemple la cycline D1. Il a été démontré que le transport du messenger la cycline D1 vers le cytoplasme est régulé à la hausse chez les patients atteints de LAM et cela est corrélé avec la surexpression d'eIF4E1. La dérégulation du transport de l'ARNm de la cycline D1 entraîne une perte de contrôle de la croissance cellulaire. De plus il a également été mis en évidence que la surexpression eIF4E1 entrave la différenciation des cellules hématopoïétiques. Pour mettre en évidence ce rôle, une lignée leucémique surexprimant eIF4E1 a été différenciée en monocytes avec un agent différenciant tel que la vitamine D3. La différenciation monocyttaire des cellules surexprimant eIF4E1 a alors été bloquée. La dérégulation du transport d'ARNm dépendant d'eIF4E1 du noyau vers le cytoplasme favorise la croissance cellulaire, diminue la différenciation et est impliquée dans la leucémogénèse.

L'implication d'eIF4E3 dans le cancer

Des résultats préliminaires ont permis de mettre en évidence que la surexpression d'eIF4E3 diminuait l'expression d'ARNm cibles d'eIF4E1 comme c-myc ou encore la cyclineD1. Cette étude a également mis en évidence une diminution de l'expression d'eIF4E3 chez les quelques patients atteints de LAM comparée aux donneurs sains alors qu'eIF4E1 est surexprimé. Ces premières analyses laissent penser qu'eIF4E3 aurait un rôle physiologique de suppresseur de tumeur ^{247,267} en réprimant l'expression d'oncogènes.

Très récemment, une corrélation a également été établie dans le cancer du sein, où les niveaux d'expression sont différents d'un patient à l'autre. L'expression d'eIF4E3 semble favorable et limiterait le développement des métastases ²⁶⁸.

L'expression d'eIF4E3 est également diminuée chez les patients atteints de carcinome hépatocellulaire par rapport aux donneurs sains ²⁶⁹. Les mêmes résultats ont été mis en évidence chez des patients atteints de carcinome épidermique de la tête et du cou ²⁷⁰.

Une étude récente réalisée sur un lymphome B a étudié l'implication traductionnelle d'eIF4E3 et de la signalisation MNK ²⁷¹. L'inhibition de MNK favorise l'activité d'un complexe d'initiation de la traduction dépendant d'eIF4E3. L'inhibition de MNK (avec un inhibiteur comme le CGP) supprime la phosphorylation d'eIF4E1 et réduit la fixation de ce dernier au niveau de la coiffe au profit d'eIF4E3. L'utilisation d'inhibiteur de MNK favoriserait une traduction dépendante d'eIF4E3 et potentialiserait sa fonction de suppresseur de tumeur.

D'après ces premières données, eIF4E3 semble dérégulé et sous-exprimé dans différents cancers, alors qu'eIF4E1 est surexprimé. Cela laisse penser qu'eIF4E3 ne peut plus jouer son rôle physiologique de suppresseur de tumeur (par sa sous-expression). Alors que son homologue (surexprimé), favorise la prolifération et la croissance tumorale. Cependant nous ne connaissons pas les dérégulations qui conduisent à une baisse d'expression d'eIF4E3. Ce facteur commence à être étudié et certaines corrélations sont observées. Il sera donc nécessaire de mieux caractériser ce facteur afin de comprendre ses fonctions biologiques et son rôle physiologique dans l'initiation de la traduction cap-dépendante.

Contexte et objectif

Ce projet de recherche s'inscrit au sein de l'équipe dans un cadre plus large visant à évaluer dans quelle mesure le contrôle de la synthèse protéique joue un rôle dans la différenciation myéloïde et dans la LAM.

En effet les nombreuses altérations génétiques impactent et compromettent les fonctions biologiques de l'organisme conduisant au développement de la LAM. Ces altérations génétiques (mutations/translocations chromosomiques) peuvent concerner des facteurs de transcriptions (RUNX1, C/EBP α ..), des régulateurs épigénétiques (DNMT3A, TET2..) ou du métabolisme (IDH1/2) ou encore des facteurs d'épissage (SRSF2, SF3B..). Il existe également des mutations des composants des voies de signalisations (FLT3, NRAS, KRAS, KIT). Toutes ces altérations génétiques engendrent des dérégulations de l'expression des gènes et perturbent les fonctions biologiques hématopoïétiques. Ce transcriptome oncogénique s'exprime grâce au complexe d'initiation de la traduction. La traduction est l'interphase qui permet l'expression des gènes en protéines. Il n'existe pas de mutation dans les facteurs régulant la traduction. Cependant les facteurs d'initiation de la traduction sont régulés par différents acteurs pouvant être mutés dans la LAM. Ces altérations génétiques se répercutent sur l'expression génique et pourraient par conséquent impacter les facteurs d'initiation de la traduction et leurs régulateurs.

Nous avons donc émis **l'hypothèse** selon laquelle des facteurs d'initiation de la traduction ainsi que leurs régulateurs pouvaient être altérés chez les patients atteints de LAM.

Afin d'explorer cette hypothèse, l'équipe a analysé un ensemble de données d'expression générées soit par séquençages ARN (que nous appellerons RNA-seq) soit par *micro-array* et incluant des échantillons normaux et des échantillons pathologiques. Les échantillons ont été obtenus soit localement à l'Institut Universitaire du Cancer de Toulouse en collaboration avec les cliniciens du site, soit à partir de bases de données publiques disponibles en ligne. L'expression de tous les facteurs régulant la synthèse protéique (initiation, élongation et terminaison de la traduction) et de tous les acteurs des voies de signalisation qui contrôlent leurs activités ont été scrutés. Deux observations claires ont retenu notre attention. Elles concernent toutes deux la voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR aboutissant à la régulation de

l'activité du facteur d'initiation de la traduction eIF4E dont la double fonction biologique est la reconnaissance de la coiffe des ARNm via l'assemblage du complexe eIF4F et le recrutement du ribosome en vue de stimuler leur traduction des ARNm en protéines.

1. Facteur d'initiation de la traduction eIF4E1 versus eIF4E3. Comme d'écrit dans l'introduction, il existe aussi trois isoformes d'eIF4E codées par trois gènes distincts : *eIF4E* (que nous nommerons *eIF4E1*), *eIF4E2*, *eIF4E3*. Nous verrons que les expressions des isoformes *eIF4E1* et *eIF4E3* ont des tendances opposées au cours de la différenciation myéloïde et inverse dans la LAM, et que cela a des conséquences sur la différenciation myéloïde monocyttaire et sur la sensibilité des cellules leucémiques aux inhibiteurs de la kinase mTOR.

2. Facteur d'initiation de la traduction et signalisation des MAPK. La signalisation des MAPK contrôle l'initiation de la traduction via la kinase d'eIF4E1, MNK. Nous déterminerons si l'inhibition de la phosphorylation d'eIF4E1 par l'utilisation d'inhibiteurs de la kinase MNK potentialise la différenciation des cellules en monocytes.

3. Signalisation PI3K-AKT-mTOR. Chez l'homme, il existe en fait trois isoformes d'AKT codées par trois gènes distincts : *AKT1*, *AKT2*, *AKT3*. Nous verrons que dans le lignage myéloïde l'expression de chacune des trois isoformes n'est pas identique et que dans la LAM leurs expressions dérégulées ont des valeurs pronostiques très différentes.

Résultats

I- Matériel et méthodes

Cohortes de patients

Cohortes d'exploration : Les patients atteints de LAM ont été diagnostiqués, prélevés, traités dans notre centre médical et enregistrés dans la collection biologique HIMIP (Hémopathies malignes de l'Inserm en Midi-Pyrénées). Pour cette étude, 40 échantillons de patients cytogénétiquement normaux (CN-AML) ont été analysés. Les données cliniques détaillées relatives à ces 40 patients ont été publiées précédemment (De clara, 2017). Pour l'étude de l'hématopoïèse normale, une cohorte de 30 donneurs sains prélevés dans notre centre médical a été analysée.

Cohortes de validation :

<http://vizome.org/aml2/10>²⁷² - <https://servers.binf.ku.dk/bloodspot/9>²⁷³

Extraction et séquençage de l'ARN

Les ARN totaux ont été extraits avec du TRIzol (Ambion). L'intégrité de l'ARN a été évaluée à l'aide du kit RNA 6000 Nano Chip (Agilent Technologies). Seuls les extraits d'ARN présentant des valeurs d'intégrité de l'ARN ≥ 7 ont été conservés. La déplétion des ARNr a été réalisée avec le kit Ribo-Zero (Epicentre). Les échantillons ont été transcrits en sens inverse à l'aide du kit de transcription inverse Superscript II (Invitrogen), conformément au protocole du fabricant. Le séquençage de l'ARN a été réalisé au BGI (Hong Kong).

Les ARN extraits à partir de cellules CD34+ (donneurs sains) ont été séquencés à l'ICM (Institut du Cerveau et de la Moelle épinière) selon un protocole de ribodéplétion.

Culture cellulaire :

Les lignées cellulaires U937 et HL-60 ont été obtenues de l'Institut Leibniz DSMZ (DSMZ 582 - ATCC CCI-240 respectivement). La lignée U937 a été cultivée dans un milieu RPMI 1640 (Sigma) et la lignée HL-60 a été cultivée dans de l'IMDM (Gibco). Le milieu a été supplémenté avec 10% (v/v) (20% pour HL-60) de sérum bovin fœtal (Eurobio), 2mM de L-glutamine (Sigma), 100U/ml de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine (Sigma).

Les cellules primaires (CD34) proviennent de sang de cordon ombilical et ont été fournies par le CRB-Cancer du CHU de Bordeaux BRIF BB-0033-00036 (membre du réseau Cancéropôle Grand Sud-Ouest). Ces cellules ont été cultivées dans un milieu commercial supplémenté (StemMACS HSC Expansion Media XF, 130-100-473 + StemMACS HSC Expansion Cocktail, 130-100-843) avec de l'interleukine 3 (IL-3 1ng/ml)²⁷⁴.

Toutes les cellules ont été maintenues à 37 °C dans une atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO₂.

Traitement des cellules :

Les lignées cellulaires ont été différenciées avec du DMSO (1.25%, Sigma), de la vitamine D3 (100nM (U937) ou 50nM (HL 60), 1α, 25-Dihydroxyvitamine D3, Sigma-Aldrich,) ou du PMA (100nM, Sigma- Aldrich).

Les CD34 ont été différenciées avec un milieu commercial (StemMACS HSC Expansion Media XF, 130-100-473 + StemMACS HSC Expansion Cocktail 130-100-843), supplémenté avec de l'interleukine 3 (IL-3, 10ng/ml) ainsi que du M-CSF (Human M-CSF, premium grade 130-096-492, 100ng/ml) et de la vitamine D3 (1α, 25-Dihydroxyvitamine D3, Sigma-Aldrich, 100nM)

Les cellules ont été traitées avec des inhibiteurs de MNK avec l'EVT (10nM), inhibiteur développé par Evotec ou le CGP57380 (C- 0993, Sigma Aldrich®), un inhibiteur multi-kinase commercial. Les cellules sont également traitées avec de la Torin1 (Sigma- Aldrich) à différentes doses (0 à 500 nM) pendant 24 ou 48 heures.

Cytométrie en flux

La différenciation des lignées cellulaires (HL-60 et U937) et des cellules primaires (CD34) a été analysée par cytométrie en flux (BD LSRFortessa™ Cell) puis les données ont été étudiées avec le logiciel BD FACSDiva. Différents anticorps ont été utilisés : CD14-PE, Biolegend, 325605 / CD11b-PE-CF594, BD Horizon, 562399 / CD15-APC, BD Horizon, 551376/ CD33 FITC Mouse Anti-Human CD33 555626 / CD34 BV421 Mouse Anti-Human CD34 562577 ainsi qu'un marqueur de viabilité FVS 575 V (Fixable viability dye, BD Horyzon 565694). Les expérimentations montrées ont été réalisées au minimum trois fois et de façon indépendante.

Transfection transitoire (siRNA) :

Les CD34 ont été transfectées avec des siRNA (ON-TARGETplus Human EIF4E3 (317649) siRNA – SMARTpool/L-032845-01-0010 et ON-TARGETplus Non-targeting Control Pool/D-001810-10-05, Horizon Discovery). La transfection a été effectuée avec le kit Amaxa P3 et la technique de l'Amaxa 4D. Les CD34 ont été mis dans un milieu permettant la différenciation, directement après la transfection des siRNA. Les expérimentations montrées ont été réalisées au minimum trois fois et de façon indépendante.

Transfection stable par lentivirus (shRNA)

La production lentivirale a été réalisée par le pôle technologique du CRCT (Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse) à partir de différents vecteurs commerciaux (Sigma-Aldrich, MISSION® pLKO.1-puro shCTL SHC002 ou MISSION® pLKO.1-puro sh4E3 : TRCN0000149667 et TRCN0000147703). Ces lentivirus ont ensuite été transduits (transfection stable) dans des lignées de LAM (HL60 et U937) par spinoculation avec de la rétronectine. La sélection des cellules transduites a été faite avec de la puromycine (1µg/ml ; ThermoFisher Scientific).

MTS

Les cellules ont été traitées (+/- Torin1) etensemencées dans des plaques 96-puits avec du milieu de culture (30 000 cellules/puits dans 100µl final). Après 24h ou 48h, 20µl de MTS ont été ajoutés aux puits (CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega). Après 2h d'incubation, la viabilité a été mesurée par densité optique à 490nm. Les expérimentations montrées ont été réalisées au minimum trois fois et de façon indépendante.

Extraction protéique et Western blot

Les cellules sont récoltées sur de la glace, lavées deux fois avec du PBS froid puis elles sont lysées dans du tampon de lyse RIPA (Trizma Base 50mM, NaCl 150mM, NP40 1%, NaF 2mM, EDTA 1mM) qui contient des inhibiteurs de phosphatases (Pierce Thermo Scientific) et des inhibiteurs de protéases (Complextablets, Mini, EDTA free, Roche). La concentration en protéines a été mesurée à l'aide du kit BC Assays Protein Quantitation Kit (Interchim), d'après une gamme étalon préparée avec de la BSA. La densité optique de chaque point a été mesurée à 562nm. Les échantillons ont été préparés avec du lysat cellulaire, de l'eau distillée et du Laemmli 4X (Tris 250mM, pH 6,8, SDS 8%, β-mercaptoéthanol 20%, glycérol 50%), et chauffés à 95°C pendant 10min. Des quantités égales de protéines sont séparées sur gels de polyacrylamide/bis-acrylamide (80V, 12% d'acrylamide) et transférées sur une membrane de nitrocellulose (BioTrace™ NT Nitrocellulose, PALL) pendant 2h30 à 250mA. Les membranes ont été lavées dans du tampon TBS - Tween 20 (TBS-T) et saturées dans du TBS-Tween/ 5 % de lait pendant 1 heure. Puis les membranes sont incubées pendant la nuit à 4°C avec des anticorps primaires dilués dans du TBS-T - 5 % de BSA. Les membranes sont lavées et incubées avec de l'anticorps secondaire (dilué au 1/2000) pendant 1h à température ambiante. Le Kit ECL (Biorad) est utilisé en quantité 1:1. La révélation se fait par le système d'acquisition Pxi (Ozyme) et le logiciel d'analyse GeneSys. Les expérimentations montrées ont été réalisées au minimum trois fois et de façon indépendante.

Anticorps primaire	Référence	Dilution
eIF4E1	Cell Signaling Technology - 2067	Dilution : 1/1000
eIF4E1 (phospho S209)	Abcam - ab76256	Dilution : 1/1000
eIF4E3	Proteintech - 17282-1-AP	Dilution : 1/1000

Actine	Sigma - A5316	Dilution : 1/5000
GAPDH	SantaCruz 32233	Dilution : 1/5000

Cap-Colonne :

Les cellules ont été lysées avec le tampon Cap-Colonne (NaCl 120mM, Hepes 50mM, EDT1 1mM, CHAPS 0,3%, GDP 0,1mM, inhibiteurs de protéases et inhibiteurs de phosphatases), le dosage protéique et les inputs ont été réalisés comme décrits dans la partie Western Blot. La cap-colonne nécessite 1000mg de protéines. Les lysats protéiques ont été mélangés avec 20 μ L de billes (m7GTP Agarose 001A Creative Biomart) et 800 μ L de tampon Cap-Colonne pendant une nuit à 4°C sur roue. Plusieurs lavages billes/lysats ont été réalisés puis les échantillons ont été préparés avec du Laemmli 4X et utilisés selon le protocole de Western-blot. Les expérimentations ont été réalisées au minimum trois fois.

II- Facteur d'initiation de la traduction eIF4E versus eIF4E3 : Article 1

1) Résultats expérimentaux

Expression des trois isoformes d'eIF4E au cours de la différenciation myéloïde normale

La première analyse a été de regarder le niveau d'expression des trois isoformes d'eIF4E au cours de la différenciation hématopoïétique humaine normale. Pour cela, nous avons analysé par RNA-seq des cellules issues de moelle osseuse triées à l'aide de marqueurs spécifiques de différentes étapes de différenciation myéloïde (des HSC aux monocytes (Mono)). L'expression de marqueurs de différenciation (CD34 pour les HSC / progéniteurs, et CD11b / CD14 pour les monocytes) a d'abord été quantifiée pour vérifier la qualité du tri cellulaire (**Figure 1A, haut**). Les données ont ensuite révélé une régulation différentielle des trois isoformes d'eIF4E. On note une augmentation transitoire de l'expression d'eIF4E1 dans les progéniteurs myéloïdes (MPP, CMP et GMP), alors que l'expression d'eIF4E3 reste stable jusqu'au stade promyélocyte (PM) puis augmente brusquement d'un facteur ~ 4 dans les monocytes (Mono) (**Figure 1A, bas**). L'expression d'eIF4E2 reste quant à elle relativement stable (résultat non montré).

Pour vérifier si des variations similaires existent dans une série d'échantillons indépendants des nôtres, une analyse similaire a été réalisée à l'aide des données de la cohorte *BloodSpot* accessible en ligne. Dans cette cohorte, les données d'expression ont été générées par *micro-array* une technique distincte du RNA-seq que nous avons réalisé avec les échantillons de donneurs locaux. Des résultats très similaires ont été obtenus avec cependant plus d'information entre les stades PM et Mono. En effet, dans les stades intermédiaires entre PM et Mono (incluant les myélocytes (MY), métamyélocytes (MM) et « band cells » (BC)) ainsi que dans les cellules à noyau polymorphe (PMN ou granulocytes), on observe un switch net entre l'expression d'eIF4E1 et celle d'eIF4E3, eIF4E3 étant exprimé jusqu'à ~ 8 fois plus qu'eIF4E1 dans les cellules différenciées que sont les granulocytes (PMN) et les monocytes (Mono) (**Figure 1B**). Dans cette cohorte aussi l'expression d'eIF4E2 reste relativement inchangée au cours de la différenciation myéloïde (résultat non montré).

Dans les données de la cohorte *bloodspot* figurent aussi les progéniteurs mégacaryocytaires et érythroïdes (MEP). On y observe une tendance similaire à celles des autres progéniteurs (MPP, CMP, GMP), à savoir une expression d'eIF4E1 supérieure à celle d'eIF4E3, avec cependant une différence plus marquée (l'expression d'eIF4E3 y est en effet plus basse)

(Figure 1B). Ces données sur les MEP seront abordées plus loin, dans la discussion de cet article.

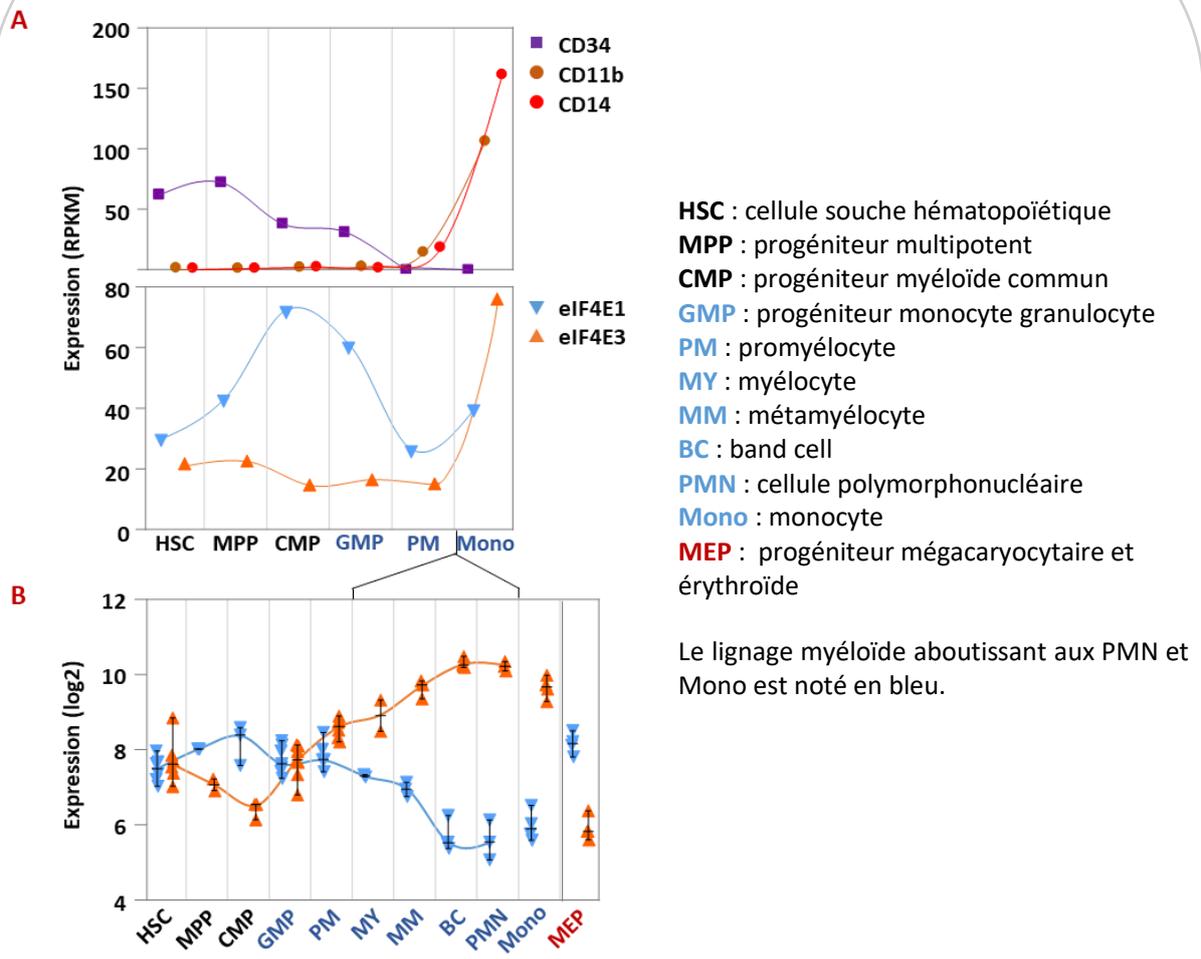


Figure 1. Expression des isoformes *eIF4E1* et *eIF4E3* au cours de la différenciation myéloïde.

(A) Quantification par RNA-seq de l'expression des transcrits de *CD34*, *CD11b* et *CD14* (haut) et des transcrits *eIF4E1* et *eIF4E3* (bas) dans les cellules triées à partir de moelles osseuses saines issues de 30 donneurs prélevés dans notre institution. Chaque point représente un pool de 30 donneurs.

(B) Quantification par micro-array de l'expression des transcrits d'*eIF4E1* et *eIF4E3* dans les cellules triées à partir de donneurs individuels de moelle osseuse saine (données issues de la cohorte BloodSpot). Sondes pour le micro-array : 201436_at (*eIF4E1*), 225940_at (*eIF4E3*). D'autres sondes donnent des tendances similaires. Barres : médianes +/- 95% CI.

Expression des isoformes *eIF4E1* et *eIF4E3* dans la différenciation myéloïde *ex vivo* ?

Pour vérifier si l'expression des transcrits d'*eIF4E1* et *eIF4E3* est bien corrélée à une expression des protéines qu'ils codent, nous avons réalisé des expériences de différenciation *ex vivo* à l'aide de cellules CD34+ triées à partir de sang de cordon ombilical (CB-CD34+), et poussées en différenciation monocyttaire à l'aide d'un milieu de primo-culture contenant un cocktail de cytokines adapté. L'efficacité de différenciation a été mesurée en cytométrie en flux à l'aide d'anticorps spécifiques des marqueurs de différenciation granulo-monocytaire CD11b et CD14 exprimés à la surface des cellules et en monitorant par RNA-seq l'expression des transcrits de *CD34*, *CD11b* et *CD14*. Les résultats sont conformes à ceux attendus pour cette expérience, à savoir une accumulation progressive de cellules différenciées pour atteindre à 7 jours ~60% de cellules doublement positives aux marqueurs de surface CD11b et CD14 (Q2-1 sur la figure) (**Figure 2A, haut**). On observe également que l'augmentation du nombre de cellules CD11b+ (zones Q1-1 et Q2-1 sur la figure) est plus précoce que celle des cellules CD14+ (zones Q4-1 et Q2-1). La cinétique d'induction de chacun de ces deux marqueurs de surface est corrélée l'augmentation de leurs transcrits respectifs, au détriment de celui de *CD34* (**Figure 2A, bas**). L'expression d'*eIF4E1* et *eIF4E3* a également été mesurée par RNA-seq (**Figure 2B, gauche**) et par Western-blot pour visualiser les protéines correspondantes (**Figure 2B, droite**). Les données montrent une belle corrélation entre l'augmentation marquée du transcrit d'*eIF4E3* et celle de sa protéine lors de la différenciation monocyttaire, alors que le transcrit d'*eIF4E1* et sa protéine varient beaucoup moins et de manière inégale.

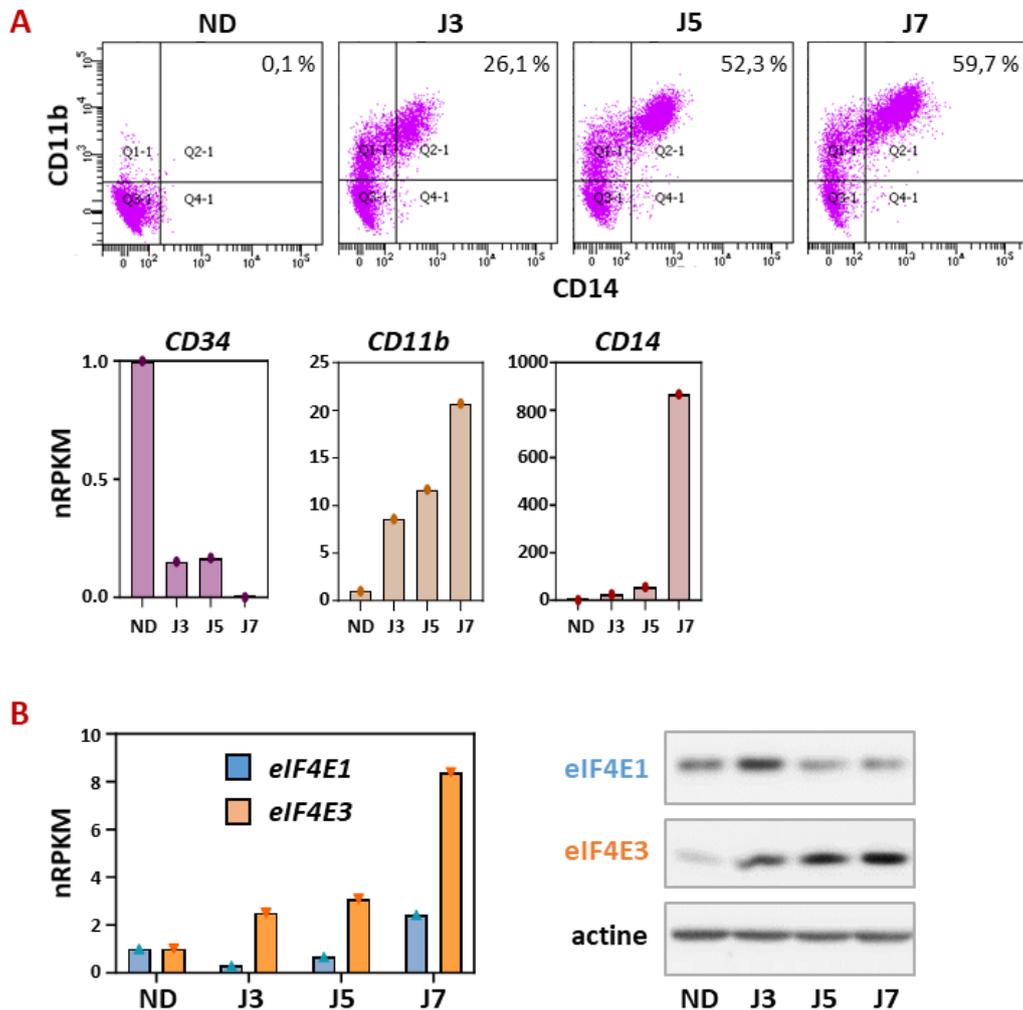


Figure 2. Différenciation myéloïde de cellules CB-CD34+ *ex vivo*.

(A) Quantification par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps anti-CD11b et anti-CD14 de la différenciation myéloïde de cellules CB-CD34+ humaines cultivées en présence d'un cocktail de cytokines (**haut**), et quantification de l'expression des transcrits de *CD34*, *CD11b* et *CD14* par RNA-seq (**bas**). Les valeurs de RPKM ont été normalisées par rapport à celles de la GAPDH (nRPKM) puis exprimées relativement à la valeur de chaque point ND lequel a été paramétré à 1.

(B) Quantification par RNA-seq de l'expression des transcrits d'*eIF4E1* et *eIF4E3*, représentation normalisée comme en (A) (**gauche**). Visualisation par Western-blot de l'expression des protéines eIF4E1 et eIF4E3 ; l'actine sert de contrôle de charge (**droite**).

ND : non différencié

J3, J5 et J7 : 3, 5 et 7 jours de différenciation.

eIF4E3 joue-t-il un rôle dans la différenciation myéloïde normale ?

Au vu des données d'expression présentées ci-dessus, qui restent descriptives, nous avons supposé qu'une augmentation de l'expression d'*eIF4E3* pouvait être requise pour la différenciation myéloïde normale. Pour vérifier cette hypothèse nous avons répété les expériences de différenciation de CB-CD34+ *ex vivo* en les combinant à une approche expérimentale de perte de fonction. Les cellules CB-CD34+ ont été transfectées le jour du démarrage de la différenciation avec des ARN interférant (ARNi, que nous appellerons siRNA) ciblant *eIF4E3* (si4E3) ou des siRNA non spécifiques utilisés comme contrôles de transfection (siCTL). La quantification par cytométrie à l'aide des anticorps reconnaissant les marqueurs de surface CD11b et CD14 des cellules différenciées montre cependant qu'empêcher l'induction d'*eIF4E3* par siRNA ne provoque qu'un ralentissement modeste de la différenciation myéloïde, avec une diminution de ~10% du nombre de cellules doublement positives CD11b+ et CD14+ (**Figure 3, haut et bas gauche**). Cependant, les si4E3 testés ne sont que partiellement efficaces. En effet, l'expression de la protéine *eIF4E3* est diminuée mais pas éteinte dans les cellules si4E3 à 2 et 3 jours de différenciation (**Figure. 3, bas droite**). L'expression de la protéine *eIF4E1* reste inchangée (résultat non montré).

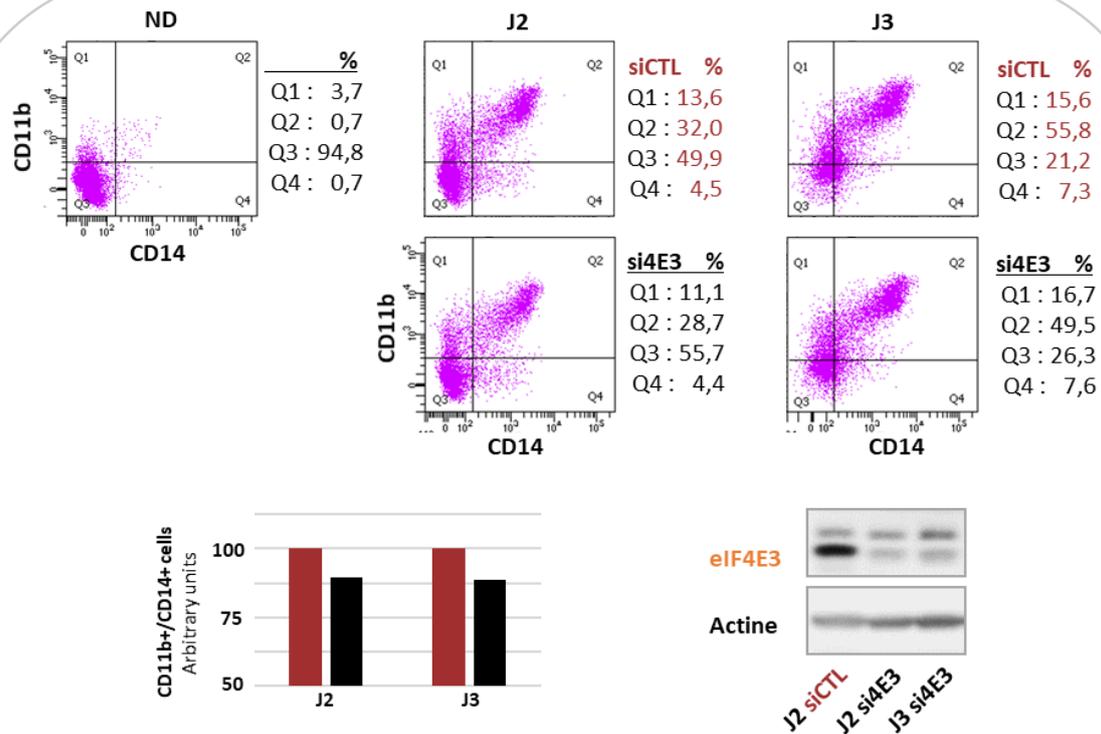


Figure 3. Rôle d'eIF4E3 dans la différenciation myéloïde normale.

Quantification par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps anti-CD11b et anti-CD14 de la différenciation myéloïde de cellules CB-CD34+ humaines cultivées en présence d'un cocktail de cytokines et transfectées soit par un siRNA contrôle (siCTL) soit par un siRNA dirigé contre *eIF4E3* (si4E3) (**haut**). Représentation du nombre de cellules doublement positives CD11b+ et CD14+ (zones Q2) au cours de la différenciation des cellules siCTL et si4E3 (**bas, gauche**). Visualisation par Western-blot de l'expression de la protéine eIF4E3 dans les cellules siCTL à J2 et les cellules si4E3 à J2 et J3; l'actine sert de contrôle de charge (**bas, droite**).

ND : non différencié.

J2, J3 et J7 : 2, 3 et 7 jours de différenciation.

Expression des isoformes eIF4E1 et eIF4E3 dans la LAM

Il existe des divergences d'expressions d'*eIF4E1* et d'*eIF4E3* au cours de la différenciation myéloïde normale. Si ces facteurs ne sont pas altérés dans la LAM, alors leur expression respective devrait suivre une tendance similaire dans les blastes leucémiques qui sont arrêtés à différents stades de différenciation. Concernant *eIF4E1* et selon ce postulat, on pouvait s'attendre à une expression plus forte que dans les cellules myéloïdes matures normales. Concernant *eIF4E3*, on s'attendait inversement à une expression plus faible dans les échantillons leucémiques puisque lui est plus spécifique des cellules myéloïdes matures

normales. Avant de vérifier cette hypothèse, nous avons tout d'abord analysé un RNA-seq (ribo-déplété) que nous avons obtenu précédemment à partir des blastes de 40 patients atteints de LAM, tous avec une cytogénétique normale (CN-AML) (voir article 2 pour les détails de cette cohorte). Dans ces échantillons de LAM on observe clairement que l'amplitude entre les valeurs extrêmes d'expression est nettement plus grande pour *eIF4E3* que pour *eIF4E1* (**Figure 4A**).

Dans la cohorte BEAT-AML qui contient 661 échantillons de LAM, un résultat très similaire a été observé : l'amplitude d'expression d'*eIF4E3* est nettement plus grande que celle d'*eIF4E1* (**Figure 4B**, comparer les échantillons LAM). Cette cohorte contient aussi deux types de cellules normales de la moelle osseuse : des cellules souches/progénitrices CD34+ et des cellules dites mononucléaires (MNC) correspondant essentiellement à des cellules matures. La comparaison entre les blastes leucémiques et ces deux populations cellulaires saines est très informative. Elle montre qu'une grande partie des blastes leucémiques expriment un niveau d'*eIF4E3* élevé équivalent à celui trouvé dans des cellules matures MNC (**Figure 4B**). Ensuite, l'expression des deux isoformes d'*eIF4E* dans les 661 échantillons de LAM a été représentée en fonction du marqueur d'HSC CD34 et des deux marqueurs de différenciation myéloïde CD11b et CD14. Si l'expression relative des deux isoformes d'*eIF4E* dans les cellules leucémiques devait ressembler à celle observée dans la différenciation normale, on s'attendrait à voir l'expression d'*eIF4E1* diminuer au profit de celle d'*eIF4E3* en passant de blastes CD34+ aux blastes CD11b+ et ou CD14+. Or, même si une tendance se dessine, ce switch est nettement moins évident dans les blastes que lors de la différenciation normale présentée dans la figure 1, en particulier pour *eIF4E3* (**Figure 4C**).

Ainsi, l'ensemble des données obtenues avec nos échantillons et ceux de la cohorte BEAT-AML indiquent que l'expression d'*eIF4E3* est très variable dans les échantillons de LAM. Ces données suggèrent aussi une dérégulation d'*eIF4E3* dans une fraction importante d'échantillons de LAM (bloqués dans la différenciation). En effet son expression est plus forte que celle retrouvée dans des cellules saines au même stade de différenciation.

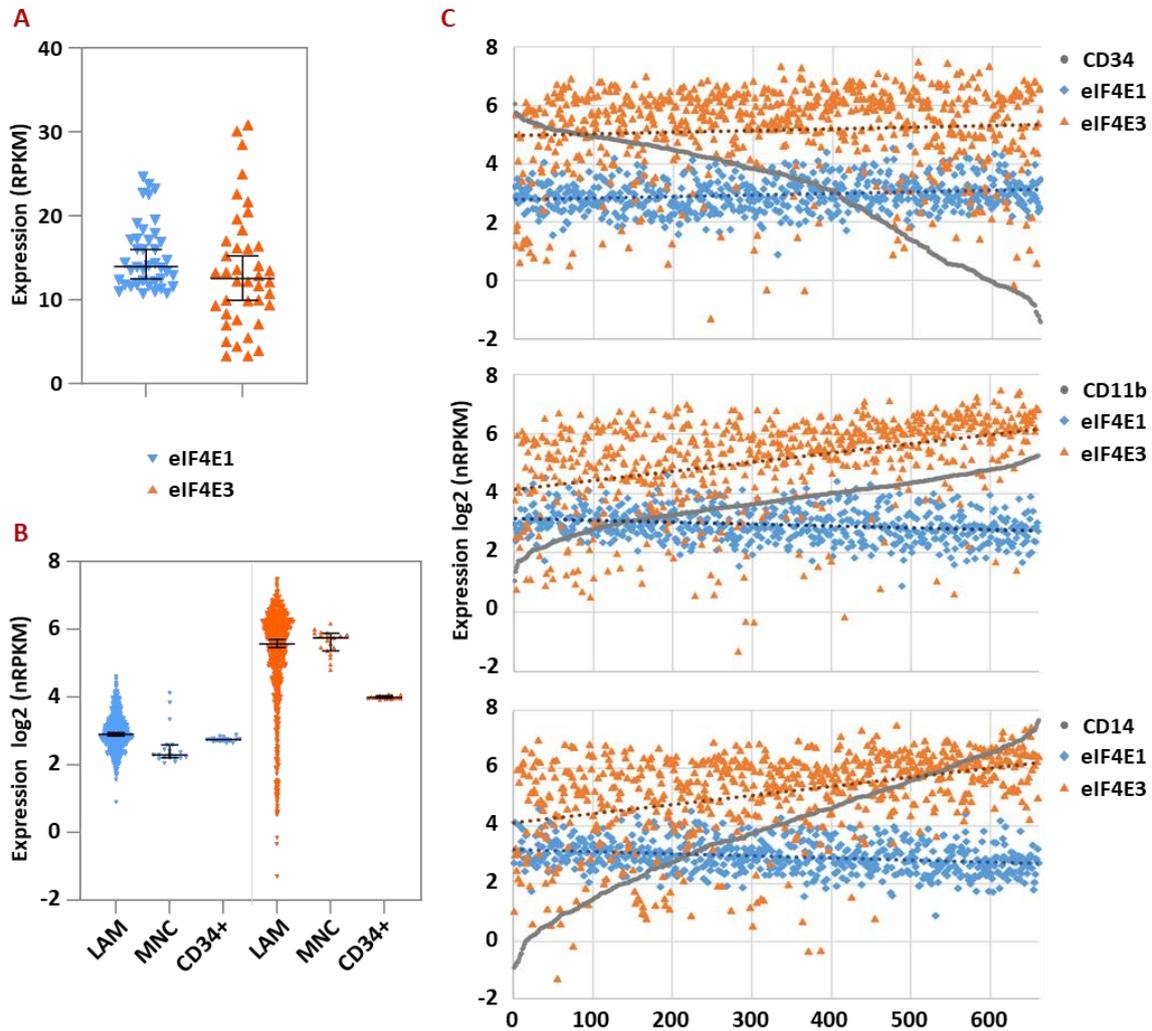


Figure 4. Expression des isoformes *eIF4E1* et *eIF4E3* dans la LAM.

(A) Expression quantifiée par RNA-seq total (RPKM) des transcrits d'*eIF4E1* et *eIF4E3* dans les blasts issus de 40 patients CN-AML prélevés dans notre institution. Barres : médianes + 95% CI.

(B) Expression quantifiée par RNA-seq poly(A) (RPKM en échelle log₂) des transcrits d'*eIF4E1* et *eIF4E3* dans les blasts issus des 661 patients (AML) et dans les cellules de donneurs sains (MNC et CD34+) de la cohorte BEAT-AML. Barres : médianes + 95% CI.

(C) Expression quantifiée par RNA-seq poly(A) (RPKM en échelle log₂) des transcrits d'*eIF4E1* et *eIF4E3* et de *CD34* (**haut**) ou *CD11b* (**milieu**) ou *CD14* (**bas**) dans les blasts issus des 661 patients LAM de la cohorte BEAT-AML. Dans ces trois graphiques, les échantillons sont classés sur l'axe des abscisses en fonction de l'expression décroissante de *CD34*, ou croissante de *CD11b* et *CD14*. Lignes pointillées : courbes de tendance pour *eIF4E1* et *eIF4E3*. Chaque point représente une valeur d'expression pour un patient.

eIF4E3 joue-t-il un rôle dans la différenciation des cellules leucémiques ?

Nous avons ensuite regardé si l'expression d'*eIF4E3* pouvait être requise pour la différenciation des cellules leucémiques. Pour cela des expériences de perte de fonction ont été réalisées à partir de lignées leucémiques établies poussées en différenciation monocyttaire à l'aide d'un milieu de culture contenant diverses molécules dont certaines sont utilisées en clinique. Le choix des lignées leucémiques établies n'a pas été trivial. On s'est rendu compte en effet qu'avec les molécules utilisées, il était impossible d'induire l'expression endogène d'*eIF4E3* dans certaines lignées, en particulier dans celles où l'expression basale d'*eIF4E3* est excessivement basse. C'est par exemple le cas de la lignée OCI-AML3 où la protéine *eIF4E3* et son ARNm sont quasi indétectables comparée aux lignées HL-60 ou U-937 qui elles expriment des quantités croissantes de la protéine *eIF4E3* et de son transcrite (**Figure 5A**). Différentes raisons pouvaient être à l'origine de l'absence d'expression d'*eIF4E3* et de sa non induction par les agents de différenciation dans certaines lignées. Parmi ces raisons, nous avons supposé qu'un mécanisme épigénétique pouvait être impliqué. Pour vérifier cela, nous avons exploré les données de la cohorte CCLE (Cancer Cell Lines Encyclopedia), où les quantifications d'expression et de méthylation sont disponibles pour 31 lignées de LAM établies. Clairement, l'expression d'*eIF4E3* est anti-corrélée à la méthylation de son locus, avec des lignées (incluant OCI-AML3) où les îlots CpG du promoteur d'*eIF4E3* sont très fortement méthylés comparées à d'autres (incluant HL-60) où ce n'est pas le cas. (**Figure 5B**). Le locus d'*eIF4E3* apparaît méthylé dans la lignée U-937 qui pourtant exprime fortement *eIF4E3*, mais cette lignée se caractérise par la présence dans ses chromosomes de trois copies du gène *eIF4E3* (=amplification génique) pouvant peut-être expliquer cette divergence.

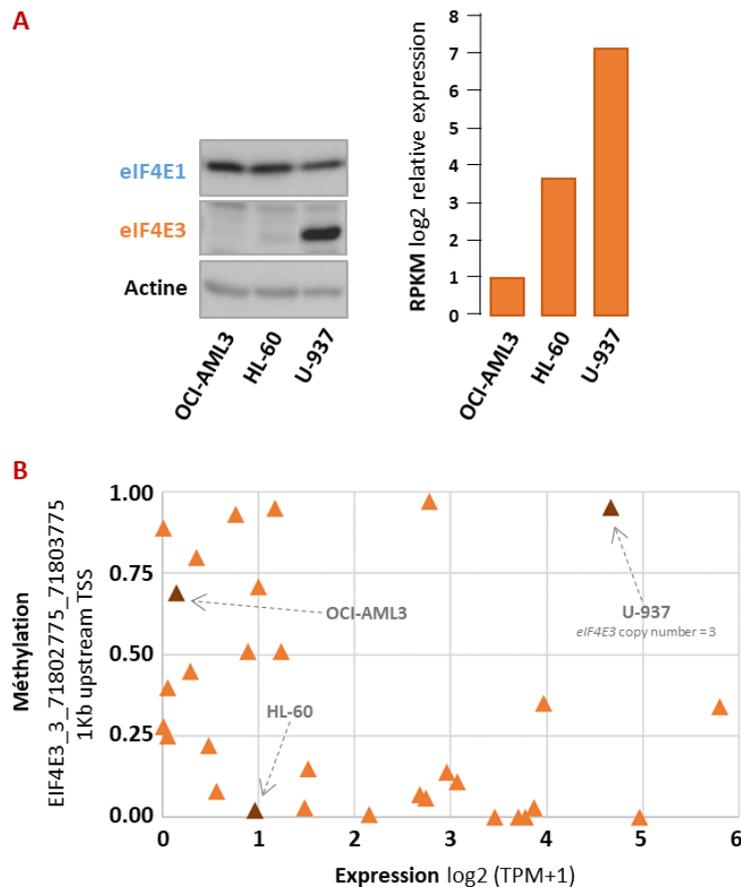


Figure 5. Expression d'*eIF4E1* et *eIF4E3* dans les lignées de LAM établies.

(A) Visualisation par Western-blot de l'expression des protéines *eIF4E1* et *eIF4E3* ; l'actine sert de contrôle de charge (**gauche**) et quantification par RNA-seq de l'expression d'*eIF4E3* (**droite**) dans trois lignées de LAM : OCI-AML3, HL-60 et U-937.

(B) Relation entre méthylation du locus *eIF4E3* et expression de son ARNm dans les 31 lignées de LAM incluses dans la base de données CCLE. Données obtenues pour la région EIF4E3_3_71802775_71803775 située dans les 1 Kb en amont du point +1 d'initiation de la transcription d'*eIF4E3*. Les trois lignées décrites en (A) sont repérées, la lignée U-937 compte trois copies du gène *eIF4E3* par cellule.

Pour évaluer le rôle d'*eIF4E3* dans la différenciation des cellules leucémiques nous avons donc réalisé des expériences de perte de fonction dans les lignées exprimant une quantité basale d'*eIF4E3* détectable au niveau ARNm et protéique, à savoir les cellules HL-60 et U-937. À cette induction d'*eIF4E3* altérée correspond un ralentissement de la différenciation myéloïde *in vitro* moins modeste que celui observé *ex vivo* avec les CB-HSC (voir plus haut). Le ralentissement est mesurable dans les deux lignées traitées chacune par deux agents de différenciation : la lignée HL-60 traitée soit par du DMSO (diméthyl sulfoxyde) (**Figure 6A, haut**) soit par de la Vitamine D3 (Vit B3) (**Figure 6A, bas**), et la lignée U-937 traitée soit par la Vit B3, soit par du PMA (phorbol 12-myristate 13-acétate, aussi appelé TPA) soit par une

combinaison Vit D3 + PMA (**Figure 7, haut**). Dans ces deux lignées établies, les shRNA ciblant le transcrite d'*eIF4E3* (sh4E3) sont efficaces puisque, comparés aux shRNA contrôles (shCTL), ils freinent l'accumulation de la protéine eIF4E3 au cours du traitement (**Figure 6A, bas, Figure 6B, bas** et **Figure 7, bas**).

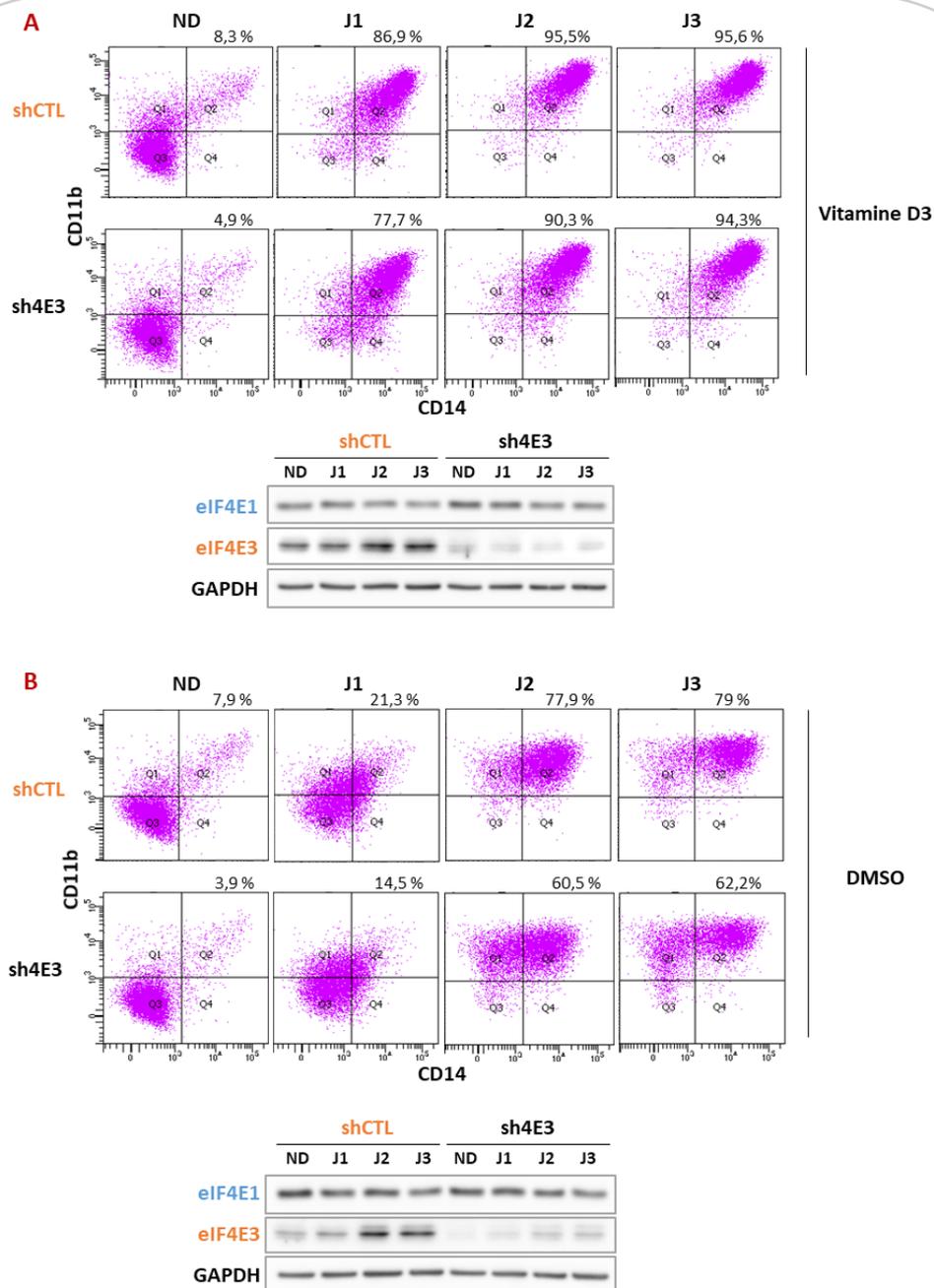


Figure 6. Rôle d'*eIF4E3* dans la différenciation de la lignée leucémique HL-60.

(A) Quantification par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps anti-CD11b et anti-CD14 de la différenciation myéloïde de la lignée HL-60 shCTL ou sh4E3 induite par la Vitamine D3 pendant 3 jours (J1 à J3) (**haut**), et visualisation par Western-blot de l'expression des protéines eIF4E1 et eIF4E3; la GAPDH sert de contrôle de charge (**bas**).

(B) Mêmes analyses mais différenciation myéloïde induite par le DMSO.

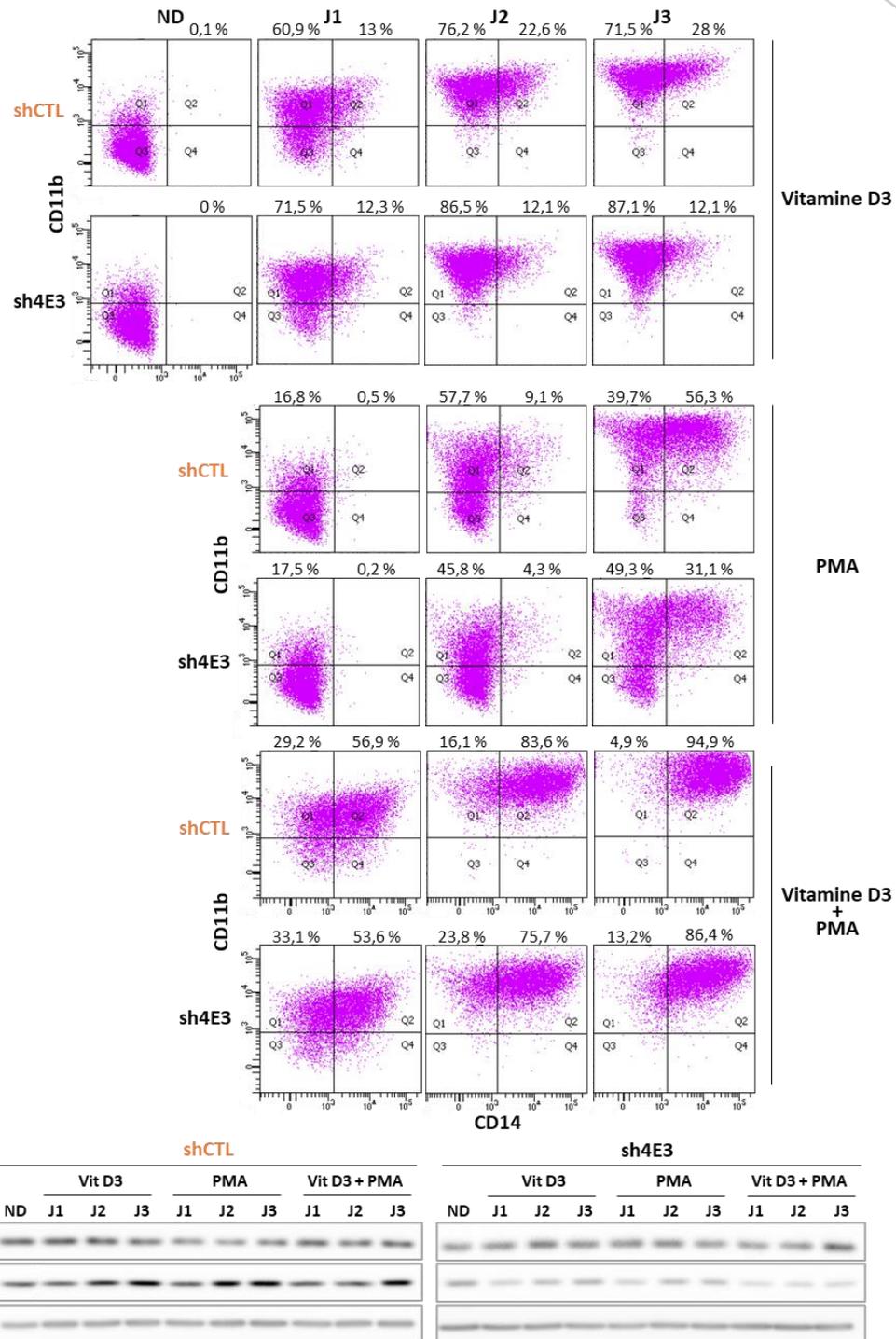


Figure 7. Rôle d'*eIF4E3* dans la différenciation de la lignée leucémique U-937.

Quantification par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps anti-CD11b et anti-CD14 de la différenciation myéloïde de la lignée U-937 shCTL ou sh4E3 induite par la Vitamine D3, ou le PMA, ou une combinaison Vitamine D3 + PMA pendant 3 jours (J1 à J3) (**haut**), et visualisation de l'expression des protéines eIF4E1 et eIF4E3 par Western-blot ; la GAPDH sert de contrôle de charge (**bas**).

La protéine eIF4E3 lie-t-elle bien la coiffe et eIF4G dans les blastes leucémiques ?

Il a été démontré qu'eIF4E3 a une affinité pour la coiffe dix fois plus faible que celle d'eIF4E1. Pour supposer qu'eIF4E3 est capable de stimuler la traduction d'ARNm dans les cellules leucémiques, il était donc important de vérifier sa capacité à lier la coiffe et aussi à lier eIF4G pour produire un complexe fonctionnel de pré-initiation de la traduction dans ces cellules pathologiques. Pour cela, nous avons réalisé des tests biochimiques de liaison à la coiffe à partir d'extraits protéiques des cellules HL-60 et U-937 préalablement cultivées en condition ou non de différenciation monocytaire. Il s'agit de tests de purification des complexes protéiques par affinité à l'aide d'une coiffe (une guanosine méthylée en position 7) liée de manière covalente à des billes d'agarose. C'est un test communément appelé « pull-down » ou « cap-colonne ». Les protéines visualisées par Western-blot après ces expériences de cap-colonne indiquent que, dans les deux lignées, eIF4E3 se lie bien à la coiffe en condition non différenciée et que cette liaison est augmentée, au détriment de celle d'eIF4E1, dans les extraits issus de cellules différenciées (**Figure 8**). Ces expériences montrent également un comportement curieux d'eIF4G. La protéine semble dégradée et est donc non détectable à sa pleine taille après cap-colonne dans les cellules non différenciées, mais stabilisée dans les cellules différenciées où elle est co-purifiée avec eIF4E3 et/ou eIF4E1 (**Figure 8**).

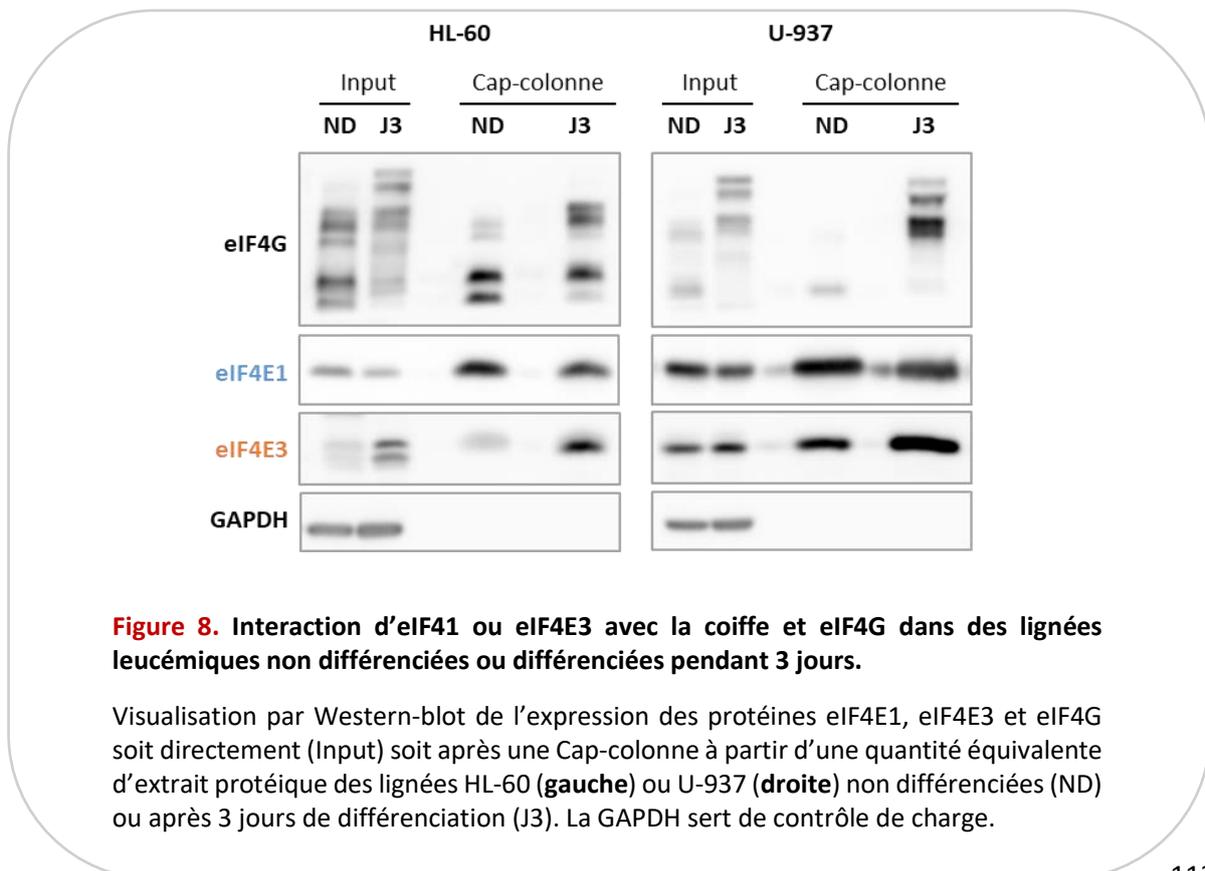


Figure 8. Interaction d'eIF4E1 ou eIF4E3 avec la coiffe et eIF4G dans des lignées leucémiques non différenciées ou différenciées pendant 3 jours.

Visualisation par Western-blot de l'expression des protéines eIF4E1, eIF4E3 et eIF4G soit directement (Input) soit après une Cap-colonne à partir d'une quantité équivalente d'extrait protéique des lignées HL-60 (**gauche**) ou U-937 (**droite**) non différenciées (ND) ou après 3 jours de différenciation (J3). La GAPDH sert de contrôle de charge.

Rôle d'eIF4E3 dans la sensibilité des cellules leucémiques aux inhibiteurs de mTOR.

Pour rappel, en tant que substrat direct de la kinase mTOR, 4E-BP1 devient hypophosphorylée lorsque la kinase mTOR est inhibée, et les formes hypophosphorylées de 4E-BP1 se lient alors à eIF4E1. Il en résulte une inhibition de la synthèse protéique cap- et eIF4E1-dépendante. Contrairement à eIF4E1, eIF4E3 ne peut pas se lier aux formes hypophosphorylées de 4E-BP1. Il était donc légitime de supposer qu'un niveau suffisant d'eIF4E3 pouvait conférer une résistance au moins partielle aux inhibiteurs de mTOR. Cela paraissait particulièrement importante pour la LAM vu les niveaux très variables d'expression d'*eIF4E3* dans les blastes leucémiques.

Des tests de sensibilité à un inhibiteur de mTOR (la Torin1) dans les lignées leucémiques établies shCTL et sh4E3 ont été réalisés. Nous avons tout d'abord vérifié l'effet de la Torin1 sur les protéines eIF4E1 et eIF4E3 à 24 et 48 heures de traitement des cellules HL-60 et U-937. L'inhibiteur provoque bien une accumulation de la forme non phosphorylée d'eIF4E-BP1 (forme α) au détriment de ses formes partiellement phosphorylée (forme β) et hyperphosphorylée (forme γ) (**Figure 9A**). Ensuite, les capacités d'eIF4E1 et d'eIF4E3 à lier la coiffe ont été analysées par des expériences de cap-colonne. Les résultats indiquent que, dans les cellules shCTL, la Torin1 provoque une légère inhibition de la liaison d'eIF4E1 à la coiffe au profit d'une interaction forte entre eIF4E3 et la coiffe. Dans les cellules sh4E3 où l'expression d'eIF4E3 est diminuée ce différentiel est nettement moins marqué (**Figure 9B**), indiquant bien qu'eIF4E1 et eIF4E3 sont en compétition pour la coiffe, et que la Torin1 provoque une forte induction de l'interaction entre eIF4E3 et la coiffe. Ces expériences ont également révélé que le traitement des cellules à la Torin1 induit l'expression de la protéine eIF4E3 (**Figure 9A et 9B**). Enfin, nous avons monitoré la prolifération/survie cellulaire par tests MTS. Les résultats suggèrent bien qu'un niveau suffisant d'eIF4E3 confère une certaine résistance aux inhibiteurs de mTOR. En effet, les cellules HL-60 ou U-937 dans lesquelles l'expression d'eIF4E3 a été partiellement altérée (sh4E3) par rapport aux cellules contrôles (shCTL) montrent un taux de prolifération/survie significativement diminué lorsqu'elles sont traitées par l'inhibiteur de mTOR (**Figure 9C**).

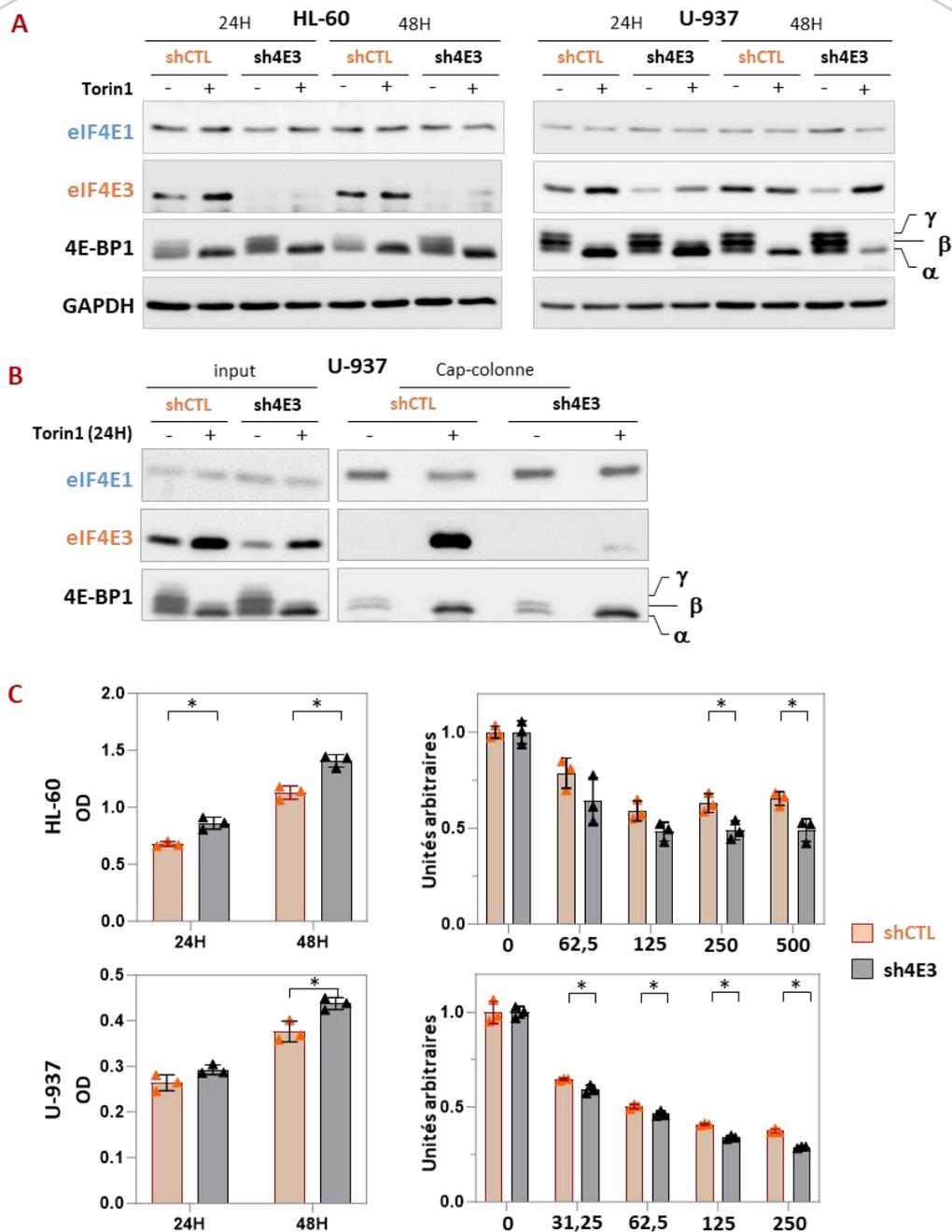


Figure 9. Rôle d'eIF4E3 dans la réponse de lignées leucémiques à l'inhibition de mTOR.

(A) Expression des protéines eIF4E1 et eIF4E3 dans les cellules HL-60 et U-937 exprimant (sh4E3) ou pas (shCTL) un shRNA contre eIF4E3 et traitées ou non avec 250 nM de Torin1 pendant 24 ou 48 heures. 4E-BP1 est visualisé comme contrôle d'efficacité de l'inhibition de mTOR : α =4E-BP1 non phosphorylé, β =4E-BP1 partiellement phosphorylé, γ =4E-BP1 hyperphosphorylé. La GAPDH sert de contrôle de charge.

(B) Liaison à la coiffe (cap-colonne) des protéines eIF4E1 ou eIF4E3 dans les cellules U-937 exprimant (sh4E3) ou pas (shCTL) un shRNA contre eIF4E3 et traitées ou non avec 250 nM de Torin1 pendant 24 heures.

(C) Tests de prolifération/survie (MTS) des cellules HL-60 et U-937 exprimant (sh4E3) ou pas (shCTL), un shRNA contre eIF4E3 pendant 24 et 48 heures (**gauche**), et traitées ou non avec des concentrations croissantes de Torin1 pendant 24 heures (**droite**). * : $p < 0,05$.

2) Discussion/Perspectives

Les différents séquençages réalisés sur nos cohortes de donneurs ou provenant de bases de données publiques ont mis en évidence une corrélation inverse entre les facteurs d'initiation eIF4E1 et eIF4E3. En effet l'expression d'eIF4E1 diminue alors que celle d'eIF4E3 augmente au cours de la différenciation myéloïde, avec une expression maximale dans les monocytes. En effet nos résultats expérimentaux sur les CD34+ ont confirmé que l'augmentation de l'expression du facteur d'initiation de la traduction eIF4E3 est positivement corrélée à l'augmentation des marqueurs monocytaires CD11b/CD14 et donc à la différenciation des cellules en monocytes. L'utilisation de siRNA pour diminuer l'expression d'eIF4E3 de façon transitoire dans les CD34+ montre une tendance à la baisse de la différenciation des cellules en monocytes. En condition physiologique, ces premiers résultats suggèrent bien qu'eIF4E3 joue un rôle dans la différenciation monocyttaire. Des colorations MGG (May-Grünwald Giemsa) ont également été réalisées afin d'analyser le changement de morphologie associé à la différenciation hématopoïétique des cellules primaires.

De plus l'induction de la différenciation dans des lignées de LAM est corrélée à une augmentation d'eIF4E3. La diminution de l'expression d'eIF4E3 (par shRNA) est corrélée avec un ralentissement de la différenciation des cellules en monocytes. Cela apporte une preuve supplémentaire que le facteur d'initiation de la traduction est impliqué dans la maturation des cellules en monocytes. De plus, il s'agit d'une diminution partielle, une perte totale d'expression d'eIF4E3 par KO devrait accentuer les effets sur la différenciation monocyttaire.

Afin de compléter mes travaux, il serait intéressant de confirmer les résultats obtenus avec des modèles « gain de fonction ». Cela permettrait de confirmer l'implication d'eIF4E3 dans l'hématopoïèse myéloïde en augmentant l'expression du facteur eIF4E3 et par conséquent la différenciation monocyttaire. Cela pourrait également se faire dans des modèles inductibles afin de démontrer l'implication d'eIF4E3 au cours de la maturation des cellules de façon progressive.

Fait intéressant, l'expression d'eIF4E3 est faible dans les MEP alors que l'expression d'eIF4E1 est importante (Figure 1B). Cela suggère que le facteur eIF4E1 semble être important pour la différenciation des cellules en mégacaryocytes ou en érythrocytes. D'après une étude récente, le facteur eIF4E1 contrôle la maturation des cellules érythroïdes en induisant un programme

de traduction spécifique²⁷⁵ et contrôle la traduction de gènes cibles essentiels (PTPN6 et d'Igf2bp1). De plus le niveau d'expression d'eIF4E1 est régulé pour permettre la traduction des ARNm cibles impliqués dans la différenciation érythroïde à des moments bien précis. Il est également montré que la surexpression d'eIF4E1 au-delà d'un niveau optimal provoque une accumulation des progéniteurs érythroïdes ainsi qu'un défaut du taux d'hémoglobines. Un mauvais timing et/ou un mauvais dosage d'eIF4E1 altère donc la maturation érythroïde.

Par analogie, ces données suggèrent un mécanisme de régulation similaire pour eIF4E3, favorisant ainsi la traduction d'ARNm cibles et spécifiques de la différenciation monocyttaire. Un mauvais timing et/ou un mauvais dosage de l'expression de ce facteur pourrait donc altérer la différenciation des cellules en monocytes. Si ce facteur est sous-exprimé ou surexprimé ou bien exprimé à un moment non adéquat alors la maturation des cellules pourra être altérée. Cela pourrait donc expliquer l'expression hétérogène d'eIF4E3 dans les blastes leucémiques (Figure 4). Des niveaux d'expression inappropriés d'eIF4E3 conduirait à la dérégulation de l'hématopoïèse et au blocage des progéniteurs myéloïdes. Cela pourrait ainsi participer au développement des LAM comme c'est le cas pour le facteur eIF4E1 dans la différenciation érythroïde.

De plus la dérégulation des facteurs eIF4E1 et eIF4E3 conduirait à la traduction d'ARNm de façon inappropriée. En effet la traduction d'ARNm doit se faire au bon moment, les ARNm traduits donnent lieu à des protéines régulant différents mécanismes biologiques. Si ces ARNm sont traduits au mauvais moment ou dans des mauvaises quantités alors les fonctions biologiques seront altérées.

La différenciation est un processus finement régulé comme nous l'avons évoqué durant l'introduction. Le niveau et la cinétique d'expression des différents facteurs contrôlant l'hématopoïèse sont alors essentiels pour permettre la maturation des cellules et maintenir l'homéostasie cellulaire.

Il serait intéressant de déterminer les mécanismes de régulation du facteur d'initiation eIF4E3. Cela permettrait de comprendre comment son expression peut être dérégulée et impliquée dans le développement de cancer. En effet plusieurs études mettent en relation l'expression d'eIF4E3 et oncogénèse^{269,270}. Cependant, la régulation de ce dernier par sa phosphorylation et/ou des voies de signalisation par exemple est toujours inconnue.

L'identification des ARNm dépendant d'eIF4E3 est essentielle afin de définir son rôle dans la différenciation monocytaire. La fixation d'eIF4E3 à la coiffe est augmentée au cours de la différenciation monocytaire, au détriment de celle d'eIF4E1. Le facteur eIF4E3 semble donc jouer un rôle dans la traduction cap-dépendante. De plus, cela suggère qu'il existe un switch traductionnel entre eIF4E1 et eIF4E3.

La dernière étape de mon projet est d'identifier les ARNm sélectivement traduits par les facteurs d'initiation de la traduction eIF4E1 et eIF4E3 dans des conditions ou non de différenciation. Identifier les ARNm traduits spécifiquement par le facteur eIF4E3 permettra de comprendre le rôle de ce dernier et par quels mécanismes il régule la différenciation myéloïde. Cette partie de mon projet est actuellement en cours d'analyse, en effet les données du séquençage viennent d'être obtenues et toute l'analyse bio-informatique doit être faite.

Pour réaliser cela, une méthode décrite de capCLIP ou RIP ²⁷⁶ (RNA immunoprecipitation) a été adaptée et utilisée. Elle consiste en une immunoprécipitation (IP) des protéines d'intérêt (eIF4E1 et eIF4E3) après un cross-link UV réalisé sur la lignée cellulaire de LAM U937. Après la réalisation des IP, les ARNm cibles liés à eIF4E1 ou eIF4E3 ont été extraits et séquencés.

La première étape a été de valider la spécificité des anticorps pour l'immunoprécipitation des deux protéines d'intérêt. En effet la conformation de l'ARN et la fixation de plusieurs facteurs d'initiation de la traduction au niveau de la coiffe peuvent créer un encombrement stérique empêchant la fixation de l'anticorps sur le facteur d'intérêt (eIF4E1 ou eIF4E3). L'anticorps peut aussi se fixer préférentiellement sur le facteur libre et non lié à la coiffe des ARNm. Une IP suivie d'un western-blot a permis de valider la technique utilisée. L'anticorps reconnaît bien eIF4E1 ou eIF4E3 dans les différentes conditions (différenciée ou non). Si l'analyse bio-informatique révèle des différences alors ces données nous permettront peut-être d'identifier et de comprendre les fonctions biologiques spécifiques du facteur d'initiation eIF4E3 au regard de celles d'eIF4E1.

Il faudra ensuite valider des cibles pertinentes pour démontrer que la traduction de ces ARNm sélectifs est bien liée à eIF4E3. Les lignées obtenues « perte de fonction » seront alors très utiles.

En revanche si cette méthode ne donne aucun résultat il faudra alors définir une nouvelle stratégie pour caractériser les ARNm cibles traduits par ce facteur. Pour cela il sera judicieux de faire différents tests de mise au point de la capCLIP ou alors utiliser une autre méthode.

L'analyse du traductome peut se faire grâce à la technique du « Polysome profiling ». Il est nécessaire d'utiliser les lignées cellulaires shCTL et sh4E3, afin de faire un traductome différentiel pour déterminer les ARNm traduits par eIF4E3. Cette technique consiste à séparer les ARNm grâce à un gradient de sucrose. Les ARNm sont séparés en fonction de leurs densités, les ARNm en cours de traduction (polysomes, fractions lourdes) sont différenciés de ceux non traduits (monosomes et ARN libres, fractions légères). Les différentes fractions sont récupérées et explorées par séquençage ARN pour mettre en évidence les ARNm impliqués dans la différenciation monocyttaire et traduits par eIF4E3.

La dernière partie de ce projet a permis de montrer qu'eIF4E3 participe à la résistance des blastes aux inhibiteurs de mTOR. En effet l'inhibition de mTOR est associée à une induction de la liaison d'eIF4E3 à la coiffe ce qui pourra conférer une meilleure prolifération/survie des cellules leucémiques. Ces données confirment donc l'hypothèse selon laquelle le niveau d'eIF4E3 est un facteur de résistance aux inhibiteurs de mTOR. Le niveau élevé d'expression d'eIF4E3 dans beaucoup d'échantillons de LAM peut expliquer au moins en partie les réponses cliniques mitigées obtenues avec les inhibiteurs de mTOR. En effet, dans l'étude publiée par notre Centre, moins de la moitié des patients avait montré une réponse clinique ²⁷⁷.

III- Facteur d'initiation de la traduction et signalisation des MAPK

1) Résultats expérimentaux

Introduction

La résistance au traitement constitue une préoccupation majeure afin d'améliorer la survie des patients. De ce fait, de nombreux travaux montrent un intérêt croissant dans l'utilisation d'inhibiteurs de la kinase MNK²⁷⁸, notamment pour le traitement de la LAM. En effet la signalisation dépendante des MAPK peut être oncogénique comme nous l'avons décrit précédemment. Le ciblage de la kinase MNK pourrait donc être une stratégie prometteuse dans le traitement des LAM. L'utilisation de ces inhibiteurs supprime la phosphorylation d'eIF4E1 sur la sérine 209 et diminue la croissance cellulaire. De nombreuses recherches démontrent le potentiel des inhibiteurs de MNK. L'utilisation d'inhibiteurs comme le SEL201²⁷⁹ (+/- azacitidine) ou le cercosporamide²⁸⁰ (+/-cytarabine) semble avoir un effet anti-leucémique en bloquant la phosphorylation d'eIF4E1 et la prolifération cellulaire dans la LAM. Une étude a comparé l'efficacité de différents inhibiteurs de MNK plus ou moins spécifiques sur les lignées leucémiques et a mis en évidence que ces inhibiteurs avaient tous un effet antinéoplasique sur des lignées de LAM²⁸¹.

Une autre étude récente a rapporté que l'Ara-C active les voies de signalisation des MAPK en induisant la phosphorylation d'Erk (facteur de la cascade de signalisation des MAPK), augmente par conséquent la phosphorylation d'eIF4E1 et améliore l'expression de protéines anti-apoptotiques. Cela jouerait un rôle important dans la rechute et la résistance aux traitements. Les inhibiteurs de MNK viendraient bloquer la phosphorylation d'eIF4E1 induite par l'Ara-C. Ces inhibiteurs potentialisent l'effet de la chimiothérapie de référence en sensibilisant les cellules leucémiques à la cytarabine^{282,283}.

Actuellement de nombreux essais cliniques sont réalisés avec les inhibiteurs des kinases MNK mais beaucoup n'aboutissent pas. Le Tomivosertib (eFT508, lymphome) ou le Mérestinib²⁸⁴ (LY2801653, leucémie chronique et LAM) sont tous deux des inhibiteurs des kinases MNK1 et MNK2. Le Mérestinib n'a pas été approuvé par la FDA pour le traitement des LAM, c'est un inhibiteur multi-kinase non spécifique, il a une activité contre 11 autres kinases²⁸⁵. Cependant, seul le Tomivosertib a été validé par la FDA pour le traitement du lymphome diffus à grande cellules et présente une haute spécificité pour la kinase MNK²⁸⁶.

Malgré la disponibilité d'inhibiteurs de MNK, de nombreux groupes pharmaceutiques sont à la recherche d'inhibiteurs plus puissants et plus spécifiques. En effet beaucoup d'inhibiteurs disponibles ont une activité multi-kinase et des effets secondaires. De ce fait, en collaboration avec une entreprise pharmaceutique Toulousaine (Evotec), nous avons mis en place des expérimentations utilisant un inhibiteur de MNK afin de démontrer le potentiel thérapeutique de cette molécule.

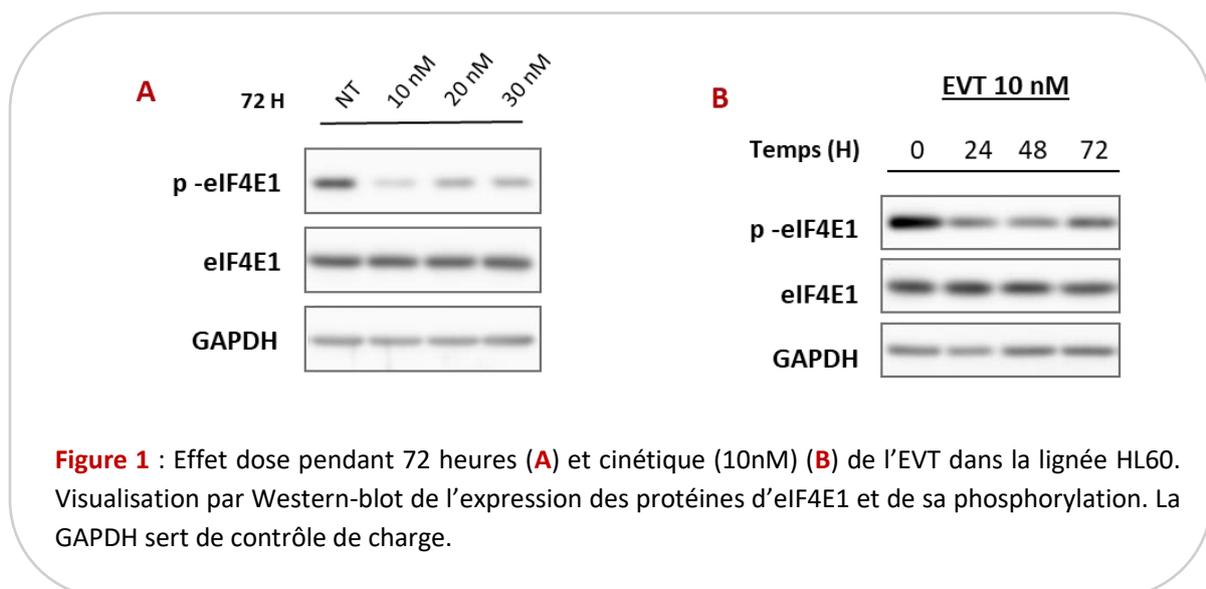
Le but de cette entreprise est le développement d'un inhibiteur spécifique de la kinase MNK, que nous appellerons EVT (pour des raisons de confidentialité). Cet inhibiteur peut être utilisé à des concentrations de l'ordre du nM, ce qui lui confère un intérêt thérapeutique intéressant et utilisable en clinique. De plus MNK est l'unique kinase d'eIF4E1, en revanche eIF4E3 échappe à la régulation par les MAPK par l'absence de la sérine 209. Cela permettrait de cibler eIF4E1 et de potentialiser une traduction dépendante d'eIF4E3. Ce switch traductionnel a également été mis en évidence suite à l'utilisation d'inhibiteurs de MNK dans le lymphome diffus à grandes cellules (DLBCL). L'inhibition de MNK supprime la phosphorylation et diminue l'expression d'eIF4E1 favorisant l'expression et la traduction dépendante d'eIF4E3²⁷¹. De plus nous avons mis en évidence précédemment qu'eIF4E1 est surexprimé dans les blastes leucémiques alors que l'expression d'eIF4E3 augmente au cours de la différenciation monocyttaire normale. L'expression d'eIF4E3 augmente également dans les lignées de LAM où la différenciation monocyttaire est induite.

D'après ces données préliminaires, nous avons donc décidé d'utiliser cet inhibiteur en combinaison avec un agent différenciant. L'hypothèse était que cette combinaison induirait la différenciation des cellules en monocytes et l'expression d'eIF4E3 tout en inhibant la phosphorylation d'eIF4E1. Le but est d'induire un switch traductionnel entre eIF4E1 et eIF4E3 et de potentialiser la traduction dépendante d'eIF4E3.

Détermination de l'effet dose et de la cinétique de l'EVT dans les lignées de LAM.

La première étape a été la mise au point des doses à utiliser et de définir la cinétique de la molécule pharmaceutique. Des tests préliminaires ont été réalisés par Evotec pour définir la spécificité de l'EVT. Cela a permis de confirmer que l'EVT cible la kinase MNK uniquement. Ces données ne sont pas montrées pour des raisons de confidentialité.

A partir de ces données, nous avons ensuite réalisé un effet dose afin de déterminer la dose d'EVT qui permet de bloquer la phosphorylation d'eIF4E1. Pour cela plusieurs doses ont été testées (10 à 30nM) sur la lignée HL60. Par Western blot, nous avons analysé la phosphorylation d'eIF4E1 qui permet de valider l'efficacité de l'EVT (**Figure 1A**). Avec seulement une dose de 10nM, la phosphorylation d'eIF4E1 est diminuée de façon importante. Ensuite nous avons cherché à identifier la durée de l'efficacité de l'EVT. Les cellules étant différenciées pendant 72h il est important de définir la cinétique de l'EVT. Pour cela, nous avons réalisé une cinétique allant de 0 à 72 heures en ne traitant les cellules avec l'EVT qu'à J0 (**Figure 1B**). La diminution de la phosphorylation d'eIF4E1 est maintenue jusqu'à 72 heures. Afin de démontrer l'efficacité de l'EVT, nous allons le comparer avec un inhibiteur bien caractérisé et utilisé en recherche ; le CGP57380 (utilisé à 20µM selon les recommandations de notre équipe).



Rôle des inhibiteurs de MNK dans la différenciation monocyttaire.

L'utilisation d'un agent différenciant (DMSO) en combinaison avec l'EVT ou le CGP devrait avoir un effet positif sur la différenciation des cellules en monocytes. Afin de déterminer l'efficacité de cette combinaison de traitement sur la différenciation, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux. Le double marquage CD11b/CD14 permet de déterminer la population de cellules différenciées en monocytes. L'analyse par cytométrie met en évidence une augmentation de la différenciation monocyttaire en comparaison avec la population non différenciée (ND). L'induction de la différenciation et l'inhibition de MNK par le CGP

potentialise la différenciation, en revanche l'EVT montre seulement une légère tendance à la hausse (**Figure 2**). Concernant la phosphorylation d'eIF4E1, une tendance à la baisse est observable au cours de la différenciation et cela est accentuée par les deux inhibiteurs. Une diminution modérée d'eIF4E1 et une surexpression concomitante d'eIF4E3 est observable au cours de la différenciation monocyttaire.

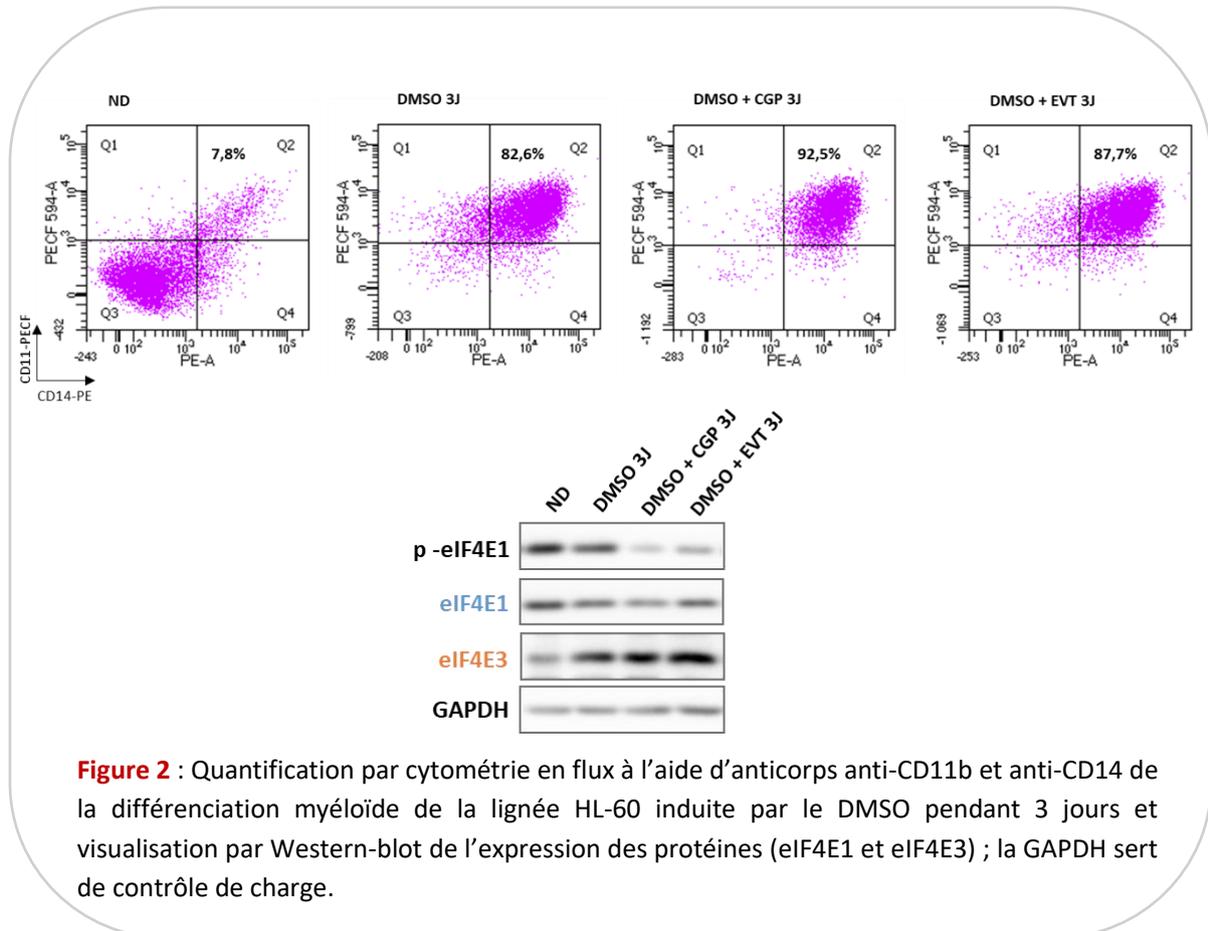


Figure 2 : Quantification par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps anti-CD11b et anti-CD14 de la différenciation myéloïde de la lignée HL-60 induite par le DMSO pendant 3 jours et visualisation par Western-blot de l'expression des protéines (eIF4E1 et eIF4E3) ; la GAPDH sert de contrôle de charge.

Ces mêmes expériences ont été réalisées sur les HL60 avec un autre agent différenciation, la vitamine D3. Les résultats obtenus sont similaires (données non montrées). Cependant la différenciation des HL60 avec la vitamine D3 est plus rapide, il faudrait donc refaire la même expérience avec des doses de vitamine D3 plus faibles pour mieux percevoir les effets des inhibiteurs.

Ces résultats préliminaires montrent un switch traductionnel entre eIF4E1 et eIF4E3 au cours de la différenciation des cellules en monocytes. Cependant l'EVT semble avoir un moindre effet que le CGP et ne potentialise que faiblement la différenciation.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons réalisé les mêmes expériences sur une autre lignée de LAM, les OCI AML 3. Fait intéressant nous obtenons les effets inverses que ceux obtenus sur la lignée HL60. Malgré la diminution de la phosphorylation d'eIF4E1, nous observons une diminution de la différenciation monocyttaire avec le co-traitement (agent différent + inhibiteurs de MNK). L'expression protéique d'eIF4E3 est quant à elle aléatoire (données non montrées). Nous avons par la suite découvert (avec des bases de données publiques CCLE) que les divergences de résultats entre les deux lignées pouvaient être dû à la méthylation du promoteur d'eIF4E3 dans la lignée OCI AML 3. Cela rend donc les expérimentations sur cette lignée compromise.

2) Discussion / Perspectives

L'objectif de ce projet était d'induire la différenciation des cellules et dans un même temps de bloquer la phosphorylation d'eIF4E1 afin de potentialiser la traduction dépendante d'eIF4E3. Ces résultats préliminaires démontrent que le CGP et l'EVT diminuent bien la phosphorylation d'eIF4E1. Cependant seul le CGP semble potentialiser la différenciation des cellules en monocytes.

Au vu des effets divergents entre les deux lignées, il serait intéressant de reproduire les mêmes expérimentations sur d'autres lignées où le promoteur d'eIF4E3 n'est pas méthylé pour valider ou non les résultats obtenus.

Afin de mettre en évidence le bénéfice des inhibiteurs de MNK et de confirmer que le co-traitement favorise une traduction dépendante du facteur eIF4E3 au dépend d'eIF4E1, il serait intéressant de réaliser une cap-colonne. Cette technique permettrait par mimétisme de la coiffe d'analyser la fixation des facteurs eIF4E3 et eIF4E1. Lorsque les cellules sont différenciées et traitées avec un inhibiteur de MNK, le facteur eIF4E3 devrait se fixer préférentiellement au niveau de la coiffe au dépend du facteur eIF4E1. Cela favoriserait la traduction dépendante d'eIF4E3 et par conséquent potentialiserait la traduction d'ARNm spécifiques probablement impliqués dans la différenciation des cellules en monocytes. De plus ce switch traductionnel entre eIF4E1 et eIF4E3 a déjà été démontré dans une autre pathologie²⁷¹. Dans le DLBCL, les inhibiteurs de MNK ont démontré un intérêt biologique en régulant l'activité d'eIF4E1 et eIF4E3.

De plus il est décrit dans la littérature que l'Ara-C active les voies de signalisation des MAPK, l'utilisation d'inhibiteurs devrait alors potentialiser les effets de la chimiothérapie et améliorer la réponse aux traitements²⁸⁷. Proposer une thérapie combinant chimiothérapie, inhibiteur de MNK et agent différenciant pourrait avoir des effets biologiques intéressants dans le traitement des LAM. La chimiothérapie par son action antinéoplasique bloque la prolifération cellulaire, les inhibiteurs de MNK contrebalancent l'effet de la chimiothérapie en bloquant les voies de signalisation des MAPK et bloquent également la phosphorylation d'eIF4E1 favorisant ainsi la traduction dépendante d'eIF4E3 et l'agent différenciant va booster la différenciation des cellules en monocytes. La combinaison de cette trithérapie pourrait montrer un bénéfice intéressant dans le traitement des LAM²⁸⁸. Il serait alors nécessaire de réaliser des expérimentations afin de valider cette hypothèse. L'analyse de la prolifération cellulaire par un test MTS permettrait de montrer si cette combinaison thérapeutique sensibilise les cellules à la chimiothérapie et apporte un intérêt dans le traitement des LAM.

D'après ces résultats préliminaires, la potentialisation de la différenciation des cellules est plus importante avec le CGP qu'avec l'EVT. Or, on s'attendait à avoir de meilleurs effets étant donné que l'EVT est spécifique de la kinase MNK. On peut alors se poser la question si les effets sur la différenciation monocyttaire sont réellement dus à l'inhibition de la phosphorylation d'eIF4E1. En effet le CGP qui semble avoir des effets plus importants sur la différenciation est un inhibiteur multi-kinase¹³. Cela peut signifier que la potentialisation de la différenciation cellulaire n'est pas seulement due à la diminution de la phosphorylation du facteur de traduction mais à l'inhibition d'autres kinases. Il serait judicieux d'identifier les autres cibles du CGP afin de comprendre par quel mécanisme la différenciation des cellules est potentialisée. On peut donc se demander quelles cibles des inhibiteurs de MNK sont à l'origine d'un effet bénéfique dans le traitement des cancers ?

IV- Signalisation PI3K-AKT-mTOR : Article 2

L'analyse de cellules issues de moelle osseuse triées à l'aide de marqueurs spécifiques de différentes étapes de différenciation myéloïde, allant de la cellule souche hématopoïétique (HSC) jusqu'au monocyte (Mono), a révélé une régulation différentielle des trois isoformes d'AKT. L'expression d'AKT1 semble suivre un profil bi-phasique, avec comme tendance une augmentation modeste jusqu'aux monocytes. Celle d'AKT2 est constante. L'expression d'AKT3 en revanche, plus forte que celles d'AKT1 et AKT2 dans les HSC et les progéniteurs multipotents (MPP), diminue progressivement dans les intermédiaires de différenciation (CMP : progéniteurs myéloïdes communs ; GMP : progéniteurs de granulocytes et monocytes ; PM : promyélocytes) jusqu'à atteindre un niveau ~4 fois inférieur dans les monocytes (**Figure A**).

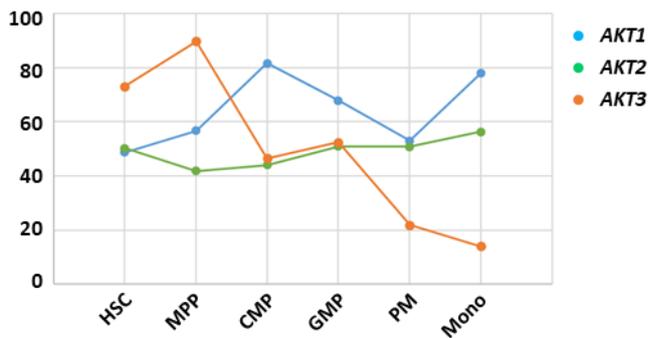


Figure A : Quantification par RNA-seq de l'expression des transcrits d'AKT1, AKT2 et AKT3 dans les cellules triées à partir de moelles osseuses saines issues de 30 donneurs prélevés dans notre institution. Chaque point représente la valeur d'expression dans un pool de 30 donneurs.

Pour confirmer (ou pas) ces observations dans une série d'échantillons indépendants des nôtres, une analyse similaire a été réalisée à l'aide des données de la cohorte *bloodspot* accessible en ligne. Des résultats très similaires ont été obtenus avec dans ces données publiques, un switch encore plus marqué entre l'expression d'AKT3 et d'AKT1 au cours de la différenciation myéloïde, AKT3 étant préférentiellement exprimé dans les cellules souches hématopoïétiques alors qu'AKT1 l'est dans les cellules différenciées. Ces données sont présentées dans la **Figure 1** de l'**article 2**, lequel a été soumis pour publication à la revue *Scientific Reports*.

Cet article expose également toutes les données obtenues dans les différentes cohortes d'échantillons de LAM. Il en ressort une différence très marquée dans le comportement de chacun des trois AKT.

Prognostic impacts of the three *AKT* isoforms in acute myeloid leukemia.

Is *AKT3* the bad AKTOR?

Eulalie Corre^{1*}, Cécile Soum^{1*}, Romain Pfeifer¹, Chloé Bessière¹, Catherine Marbœuf¹, Fabienne Meggetto¹, Christian Touriol¹, Christian Récher², Marina Bousquet¹ & Stéphane Pyronnet¹

¹Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), INSERM UMR-1037, CNRS UMR-5071, Université de Toulouse, Toulouse, France

²Institut Universitaire du Cancer (IUCT), Service d'hématologie, Toulouse, France

*Equal contribution

✉stephane.pyronnet@inserm.fr

ABSTRACT

The PI3K-AKT-mTOR pathway lies at the confluence of signaling pathways in which various components are subjected to activating genetic alterations in acute myeloid leukemia (AML), thus contributing to oncogenesis. Three *AKT* isoforms exist in humans. However, whether one isoform predominates in AML remains unknown. This study reveals that *AKT3* behaves very distinctly than *AKT1* or *AKT2* in both normal myeloid differentiation and AML. In the course of normal differentiation, a switch occurs between *AKT3* and *AKT1* expressions. *AKT3* is preferentially expressed in hematopoietic stem cells whilst *AKT1* becomes preferentially expressed as cells differentiate into monocytes. *AKT2* expression remains unchanged. In AML, *AKT3* expression varies widely among patient samples and is counterintuitively correlated to expression of the *CD11b* and *CD14* genes, two monocyte markers. Furthermore, a low level of *AKT3* expression is strongly correlated to genetic alterations associated with a better outcome (*NPM1* mutations and *RUNX1-RUNX1T1* translocation), whilst a high level is correlated to a genetic alteration associated to a bad outcome (*RUNX1* mutations). Neither *AKT1* nor *AKT2* expression associates with AML mutations or translocations. Consistently, a high *AKT3* expression level appears as a very strong predictor of poor survival. Curiously, although modestly varying among AML samples, a high *AKT1* expression level shows in contrast as a strong predictor of a better patient outcome. These data suggest that *AKT3* and *AKT1* expressions have strong, yet opposite, prognostic values.

INTRODUCTION

Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous disease. It is characterized by a plethora of genetic alterations including various chromosomal translocations and/or a wide variety of mutations, whose nature allows a classification of patients according to their chances of survival. One classification that has been accepted for several years is that given by the European LeukemiaNet in 2017 (ELN-2017¹) and updated in 2022 (ELN-2022²). Depending on the nature of the cytogenetic abnormalities and mutations detected at diagnosis, this classification divides patients into three groups: the "adverse" group with a risk of poor survival, the "favorable" group with an expected better prognosis, and an "intermediate" group. However, even if this scoring remains a good assessment, the survival of patients in each of these groups can be heterogeneous. The detection of genetic abnormalities at diagnosis may also help the clinician to propose a targeted therapy, generally prescribed as a second-line of treatment. Indeed, the majority of AML patients are first treated with intensive chemotherapy to harness the lethal acute phase. Although some patients are refractory, many go into remission after this induction chemotherapy. To reinforce the treatments and to delay the relapses, patients can then benefit from a milder protocol known as consolidation chemotherapy, and/or benefit from a targeted therapy. There are therapies specifically targeting genetic alterations, such as inhibitors of the mutated FLT3 kinase, inhibitors of the mutated IDH1 and IDH2 enzymes, or molecules targeting DNA methylation, as frequent mutations affect various genes (e.g. *DNMT3A*, *TET2*) whose protein products are involved in the regulation of DNA methylation. Targeted therapies include also BCL2 inhibitors, prescribed mainly to unfit patients who are not eligible for intensive chemotherapy. A wide range of molecules targeting less specific features has also been tested in pre-clinical settings as potential therapeutics against AML. These include molecules impinging upon major signaling pathways that are activated in leukemic cells but also in many other cancers. This is for instance the case for compounds inhibiting the AKT protein kinase.

AKT is a serine/threonine kinase playing major roles in intracellular signaling pathways. It is one key actor in the PI3K-AKT-mTOR pathway which senses environmental signals such as growth factors and nutrients availability, and converts these cues into survival, growth and/or proliferation capabilities. Of note, the PI3K-AKT-mTOR pathway controls the rate of protein synthesis and consequent cell growth³, a pre-requisite for entering the cell cycle. Given these

critical properties, AKT has attracted much attention from the medico-scientific community, particularly in the cancer field, and AKT inhibitors have been designed for research purposes and for clinical perspectives⁴. Although *AKT* itself is rarely mutated in AML, the kinase lies at the confluence of several signaling pathways in which various components can themselves be activated by gene mutations (e.g. *FLT3*, *KIT*, *NRAS*, *KRAS*, *PIK3CB*...). However, the use of AKT inhibitors in pre-clinical settings has been disappointing, with a globally non-convincing benefit/risk ratio. After all, AKT also plays important physiological roles in healthy cells. Targeting AKT can therefore provoke significant adverse effects which limit the applicable doses. Yet, there are three distinct *AKT* genes in human, encoding three different proteins: AKT1, AKT2 and AKT3. Recent studies indicated that these three AKT proteins show tissue-specific distributions and that each may exhibit different affinities for various partners and may therefore touch more specifically one pathway than another. Indeed, although the three human AKTs possess a relatively well conserved overall amino-acid sequence, they harbor some sequence divergences and distinct intracellular localizations. Both of these features might perhaps explain the fact that they can interact with and phosphorylate different partners. However, although some AKT1 versus AKT2 substrate specificities have been identified, much less is known about AKT3 specific targets⁵. In a more recent report, while AKT1 was described as preferentially located in close proximity of the plasma membrane, AKT2 appeared more cytosolic and AKT3 seemed anchored to the nuclear envelope, facing the cytosol⁶. In the same report, AKT3 has been suspected to be constitutively activated in a series of established cancer cells (no leukemic cells were included in this study), although the mechanism responsible for such a permanent activation remains unknown. This observation reinforced an earlier report saying that AKT3 is also constitutively activated in a glioma cell line⁷. Unfortunately, none of the AKT inhibitors available to date exhibit an isoform specificity strong enough to target selectively AKT3⁵. Thus, the development of inhibitors specific to each AKT isoform could be of clinical interest.

In this study, we examined the expression of the three *AKT* isoforms in normal hematopoiesis and in AML samples from a thousand of patients emanating from cohorts established in different countries (France, USA, Canada). All the data clearly converge toward *AKT3* as being the bad in AML.

MATERIAL & METHODS

Patients and tumor samples

AML exploration cohort. AML patients were diagnosed, sampled and treated in our medical center and registered at the HIMIP (Hémopathies INSERM Midi-Pyrénées, France) collection. For this study, 40 cytogenetically normal AML (CN-AML) samples were analyzed. Detailed clinical data related to these 40 patients have been published earlier⁸.

Ethics approval. In accordance with French law, all donors and patients were informed and the HIMIP collection has been declared to the Ministry of Higher Education and Research (DC 2008-307) and a transfer agreement has been obtained (AC 2008-129) after approbation by local ethical committees (the “Comité de Protection des Personnes Sud-Ouest et Outremer II”). Clinical and biological annotations have also been declared to the CNIL (“Comité National Informatique et Libertés”).

Normal hematopoiesis and validation AML cohorts. As cohorts for normal hematopoiesis and for validation in AML, we used three different public sources of data available *on-line*:

<https://servers.binf.ku.dk/bloodspot/>⁹

<http://vizome.org/aml2/>¹⁰

<https://data.leucegene.iric.ca/survival?lang=en>

RNA extraction, ribo-depletion and reverse transcription.

Total RNAs were extracted with the TRIzol reagent (Ambion, Austin, TX, USA). RNA integrity was evaluated using the RNA 6000 Nano Chip kit (Agilent Technologies, Massy, France). Only RNA extracts with RNA integrity values ≥ 7 underwent further reverse transcription. rRNA depletion was performed from total RNA with Ribo-Zero™ rRNA Removal Kits (Epicentre, Madison, WI, USA). All samples were reverse transcribed using the Superscript II reverse transcription kit (Invitrogen, Beijing, China), according to the manufacturer's protocol.

RNA-seq

RNA sequencing was performed at the BGI (Hong Kong). Paired-end, strand-specific reads of ~100 nucleotides were generated on an Illumina HiSeq™2000. Alignment and mapping were performed using Tophat1 against the hg19 genome and the mapped reads were assembled by Cufflinks 2.0.22. The Cuffcompare program was used to merge the RefSeq, ENCODE and

UCSC human known genes freeze January 2013 into one gene annotation set for comparison with the assembled transcripts¹¹.

Statistical analyses

Group of samples were compared each other by using the unpaired Student t test (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.005$, ****: $p < 0.001$). Overall survival (OS) time was calculated from the date of diagnosis until death or last received news. Surviving patients were censored at the date of last follow-up.

RESULTS

Expression of the three AKTs in normal myeloid differentiation.

To generate a picture of how the three *AKT* genes are expressed in the different myeloid lineages, analyses of micro array data from the public Bloodspot-HemaExplorer⁹ cohort were performed on bone marrow cells sorted by FACS with the help of specific markers distinguishing different steps of myeloid differentiation, staging from the hematopoietic stem cell (HSC) to the monocyte. The data revealed that *AKT1* expression shows a bi-phasic but significant increase along myeloid differentiation, *AKT2* expression remains constant, while the initial higher expression of *AKT3* detected in HSCs decreases gradually but strongly as cells progress toward the terminal monocyte stage (Fig. 1).

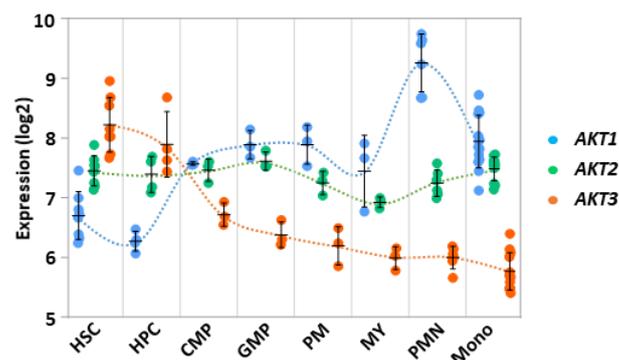


Figure 1. Expression of the three *AKT* transcripts in normal hematopoiesis.

Each dot in the curves shows micro-array normalized expression of each of the three *AKT* transcripts in cells sorted from individual healthy bone marrow donors of the BlooSpot-HemaExplorer pool of samples. X axis: HSC=hematopoietic stem cell; HPC=hematopoietic progenitor cell; CMP=common myeloid progenitor; GMP=granulocyte monocyte progenitor; PM=promyelocyte; MY=myelocyte; PMN=polymorphonuclear cell, Mono=monocyte. Array probes: 207163_s_at (*AKT1*), 225471_s_at (*AKT2*), 212609_s_at (*AKT3*). Other probes gave similar tendencies. Bars represent means +/- SD.

Expression of the three AKTs in AML samples.

Given the opposite variations of *AKT1* and *AKT3* expressions and the constant expression of *AKT2* in the course of normal myeloid differentiation, one could expect that their respective expression should follow a similar tendency in the different types of AML samples which are arrested at different stages of differentiation. To verify this hypothesis, we analyzed a bulk RNA-seq we have performed earlier on the leukemic cells, also called blasts, of 40 AML patients all with normal cytogenetics (CN-AML)⁸. The results indicated first that expression of *AKT3* in blasts is globally weaker than those of *AKT1* and *AKT2*. However, the range of *AKT3* expression among samples appears much wider, with a ~120-fold difference between its level in the sample expressing the most *AKT3* as compared to its level in the one expressing the less *AKT3*. In the same samples, the variations in *AKT1* and *AKT2* expressions are very much less marked with an only ~3-fold amplitude for each isoform (**Fig. 2A, left**). Next, the expression of each of the three *AKT* isoforms was plotted as a function of the two myeloid differentiation markers *CD11b* and *CD14*. Curiously, in contrast to the clear decreasing expression of *AKT3* seen during the course of normal myeloid differentiation (see above), *AKT3* expression in leukemic blasts does not follow the same tendency but seems instead to slightly go up with expression of the myeloid differentiation marker *CD11b* and to a lesser extent to that of *CD14*, while expression of the other two *AKTs* either does not change (*AKT1*) or tends to slightly decrease (*AKT2*) (**Fig. 2A, right**).

To gain in significance, the expression of the three *AKTs* was also looked on the BEAT-AML public data set containing 672 AML RNA-seq samples including samples with both normal and abnormal cytogenetics¹⁰. Similar yet much more pronounced observations were made for *AKT3* expression. Clearly, although globally weaker, *AKT3* expression among AML samples is much more variable than those of *AKT1* and *AKT2* (**Fig. 2B, left**). Furthermore, as opposed to what was observed in normal differentiation, *AKT3* expression is here nicely correlated to the expression levels of both *CD11b* and *CD14* myeloid differentiation markers, while in the meantime those of both *AKT1* and *AKT2* slightly decrease (**Fig. 2B, right**).

Taken together, these data suggest that the regulatory mechanisms targeting expression of the three *AKTs* in leukemic blasts are distinct than those involved in normal myeloid differentiation.

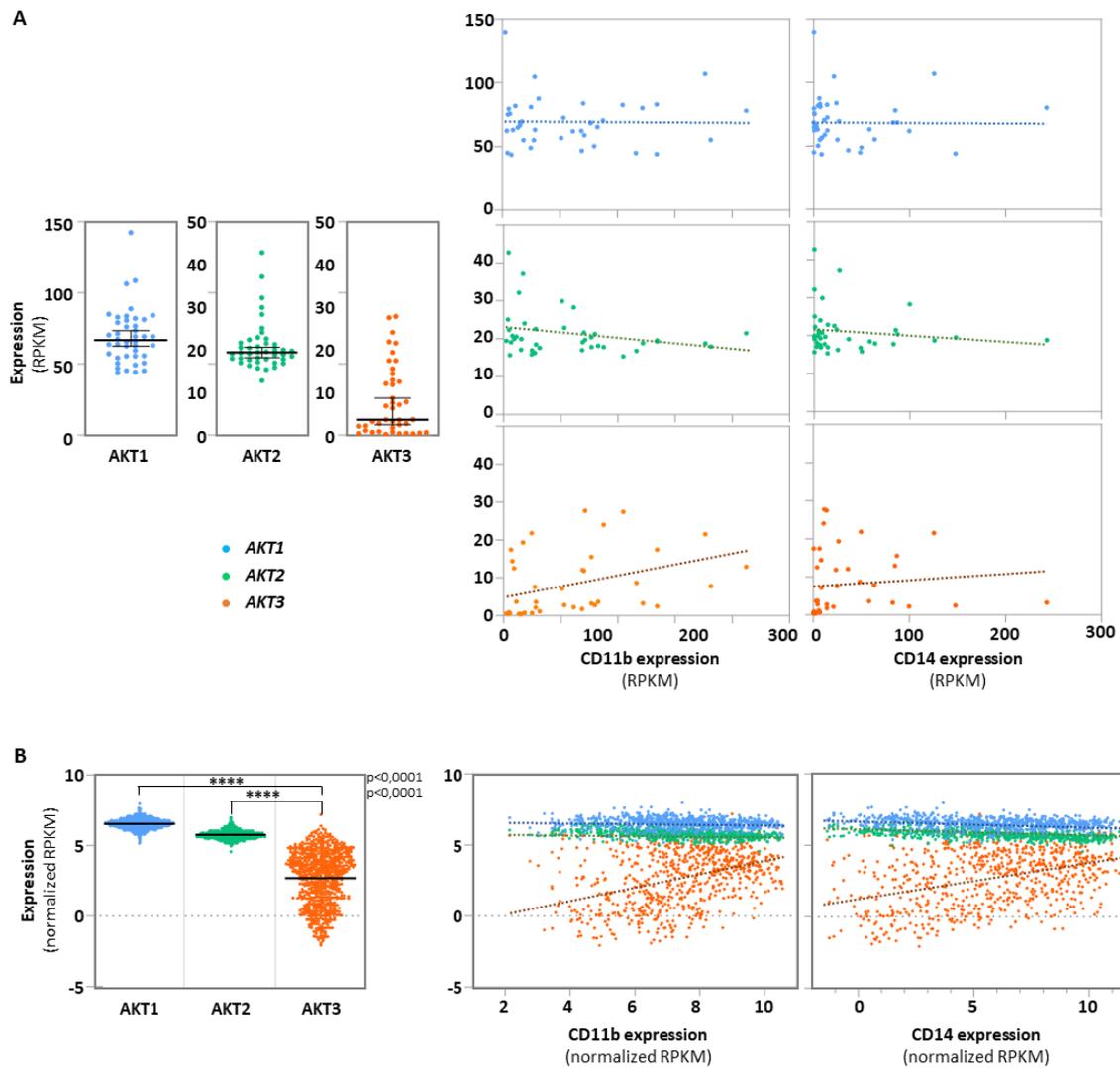


Figure 2. Expression of the three AKT transcripts in AML samples.

(A) Each dot shows expression of each the three AKTs (left, bars represent medians with 95% CI), or expression of each the three AKT as a function of *CD11b* or *CD14* expression (right, tendency curves are shown as dotted lines) in 40 CN-AML samples from our institution.

(B) Each dot shows expression of each the three AKTs (left, bars represent medians with 95% CI), or expression of each the three AKT as a function of *CD11b* or *CD14* expression (right, tendency curves are shown as dotted lines) in the 676 samples of the BEAT-AML cohort.

Expression of the three AKTs and ELN-2017.

As AKT3 expression is highly variable among AML samples, we thought it could be significantly correlated to some clinical parameters. We first looked at the expressions of the three AKTs as a function of the ELN-2017 score which distributes the patients into three groups of differently predicted outcomes: adverse, intermediate or favorable. Here again, AKT3 is clearly distinguishable from the other two AKTs. Unfortunately, in our cohort encompassing 40 AML samples, no sample is categorized as adverse, but 8 are in the favorable group and 32 are considered as intermediate. Despite the lack of an ELN-2017 adverse group, a strong difference in AKT3 expression is visible between the intermediate and the favorable group, a low expression of AKT3 being a clear mark of the favorable entity (**Fig. 3, left**). We then looked at the BEAT-AML cohort which contains a copious number of samples in each of the three ELN-2017 groups. Consistently with our cohort, samples of the favorable group are those expressing very significantly the less AKT3 as compared to samples of the adverse and intermediate groups showing a higher expression of AKT3 (**Fig. 3, right**). In both cohorts, a slightly higher expression of AKT1 or AKT2 appears in contrast in the favorable group, although the differences are much less marked than the opposite difference seen with AKT3, likely because the expressions of both AKT1 and AKT2 are much less variable among samples than that of AKT3 (**Fig. 3**).

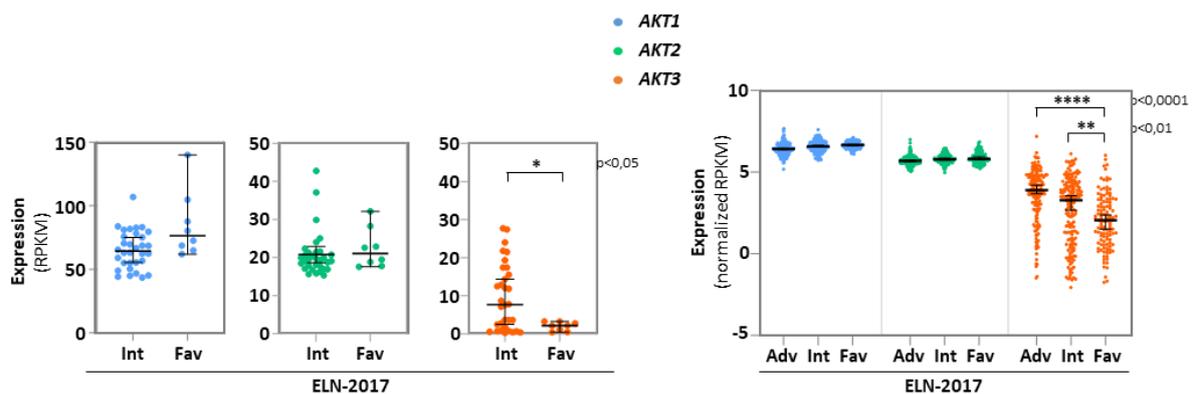


Figure 3. Expression of the three AKT transcripts as a function of ELN-2017 score.

Each dot shows expression of each the three AKTs as a function of ELN-2017 score in 40 CN-Normal AML samples from our institution (**left**), or in the 672 samples of the BEAT-AML cohort (**right**). X-axes legends: Adv=adverse; Int=intermediary; Fav=favorable. Bars represent medians with 95% CI.

Expression of the three AKTs and genetic status.

NPM1 mutations. Since the ELN-2017 score is based on the nature of the genetic alterations found in AML samples and because *AKT3* expression is significantly higher in the adverse group than in the favorable and intermediate groups, it was probable that some of these genetic abnormalities could be either correlated or anti-correlated to the level of *AKT3* expression. We therefore looked at the expressions of the three *AKT* isoforms as a function of the most frequent mutations in our 40 AML samples cohort. *NPM1* is the most frequently mutated gene in AML (approximately 30% of patients). Mutations in *NPM1* create a sequence frameshift converting the nuclear localization signal located in the carboxyl-terminus of the protein into a nuclear export signal. As a consequence, the mutant proteins are localized in the cytosol (and are called *NPM1c*), while the wild-type protein (*NPM1wt*) shuttles between the nucleus and the cytoplasm. Interestingly, in our 40 CN-AML cohort a lower level of *AKT3* expression is clearly visible in the 14 *NPM1c* AML samples as compared to the 26 *NPM1wt* samples (**Fig. 4A**).

To confirm this observation in a bigger series of samples, we repeated this analysis on the BEAT-AML cohort which contains 174 *NPM1c* samples out of 667 samples for which both the *NPM1* mutational status and the RNA-seq data are available. Consistently with our modest cohort, a strong correlation exists here between *NPM1c* and a low expression of *AKT3* (**Fig. 4B, left**). We then plotted the level of expression of the three *AKT* isoforms as a function of *NPM1* expression in either *NPM1wt* or *NPM1c* samples. In *NPM1wt* samples, the expression of *AKT3* appears slightly inversely correlated to that of *NPM1*, while no correlation is detected with *AKT1* or *AKT2* (**Fig 4B, right**). In *NPM1c* samples such anti-correlation between *AKT3* and *NPM1* expressions is much more pronounced, while in contrast the expressions of both *AKT1* and *AKT2* tend to increase (**Fig. 4B, right**).

These data reveal clearly a strong downregulation of *AKT3* in AML samples carrying a mutated *NPM1* gene. Furthermore, the level of *AKT3* expression is inversely proportional to that of *NPM1*, an anti-correlation strongly reinforced when *NPM1* is mutated.

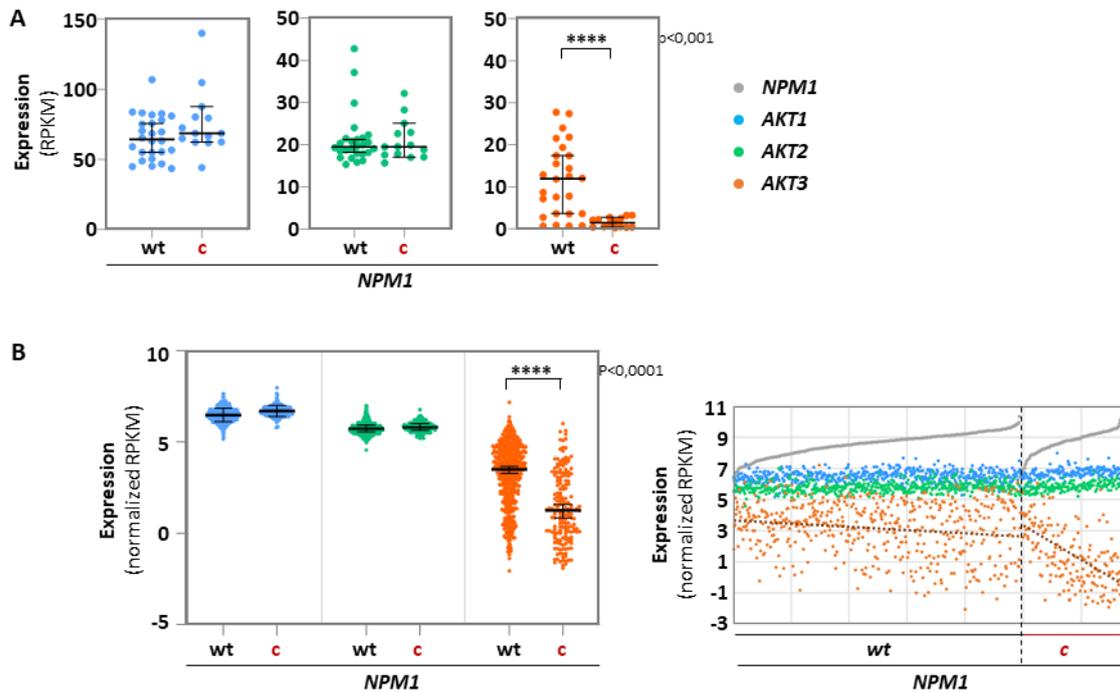


Figure 4. Expression of the three AKT transcripts as a function of NPM1 mutational status.

(A) Each dot shows expression of each the three AKTs as a function of NPM1 mutational status in 40 CN-Normal AML samples from our institution. Bars represent medians with 95% CI.

(B) Each dot shows expression of each the three AKTs as a function of NPM1 mutational status in the 672 samples of the BEAT-AML cohort (left, bars represent medians with 95% CI). Expression of the three AKTs in the BEAT-AML cohort as a function of NPM1 expression: in the two NPM1wt (wt) or NPM1c (c) groups, the samples are ranked from left to right as a function of global NPM1 expression (right, tendency curves are shown for AKT3 as dotted lines).

RUNX1 mutations & RUNX1-RUNX1T1 translocation. No significant correlation between expression of each of the three AKTs and any other mutation could be detected in our cohort. However, this lack of correlation might be explained by the fact that many mutations are much less frequent than the mutations of NPM1, and therefore do not permit statistical analyses within a series containing 40 samples. However, correlations between the expression level of AKT3 and the Runt-related transcription factor 1 (RUNX1) genetic alterations emerged in the BEAT-AML cohort. Indeed, AKT3 expression appears very significantly higher in the 74 samples harboring mutations in RUNX1, and in contrast significantly lower in the 16 samples harboring the t(8;21) (RUNX1-RUNX1T1) chromosomal translocation (Fig. 5, left). We then plotted the level of expression of the three AKT isoforms as a function of RUNX1 expression in either RUNX1wt, RUNX1mut or RUNX1-RUNX1T1 samples. In RUNX1wt samples, the expression of

AKT3 appears inversely correlated to global expression of *RUNX1*, while no correlation is detected with *AKT1* or *AKT2*. In *RUNX1mut* and *RUNX1-RUNX1T1* samples no correlation between *any* of the three *AKTs* and global expression of *RUNX1* is visible (**Fig. 5, right**).

These data show clearly a strong upregulation of *AKT3* in AML samples carrying a mutated *RUNX1* gene, but in contrast a downregulation of *AKT3* in samples harboring the *RUNX1-RUNX1T1* translocation. Furthermore, the level of *AKT3* expression appears inversely proportional to that of *RUNX1* in *RUNX1wt* samples, a tendency no longer visible in *RUNX1* genetic variant samples.

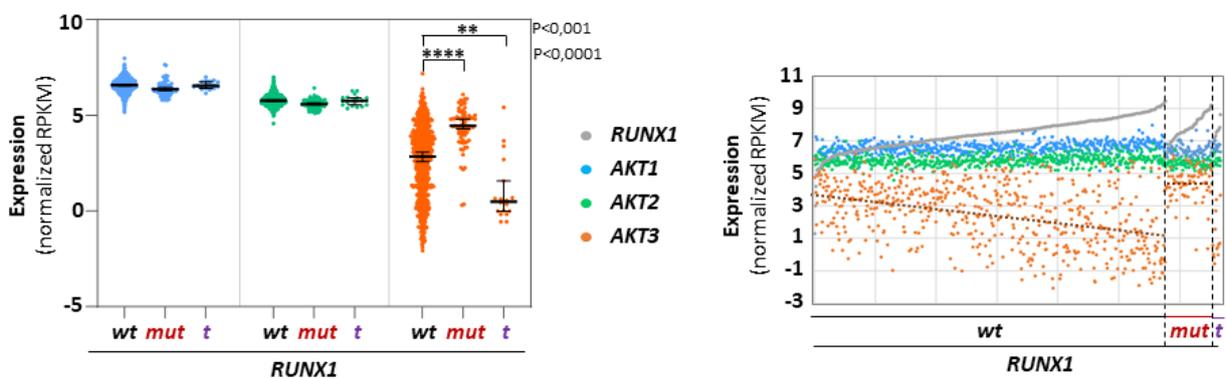


Figure 5. Expression of the three *AKT* transcripts as a function of *RUNX1* genetic status.

Each dot shows expression of each the three *AKTs* as a function of *RUNX1* mutational status in the 672 samples of the BEAT-AML cohort (**left**, bars represent medians with 95% CI). Expression of the three *AKTs* in the BEAT-AML cohort as a function of *RUNX1* expression: in the three *RUNX1wt* (*wt*), *RUNX1mut* (*mut*) or *RUNX1-RUNX1T1* (*t*) groups, the samples are ranked from left to right as a function of global *RUNX1* expression (**right**, tendency curves are shown for *AKT3* as dotted lines).

Expression of the three *AKTs* and Overall survival.

The observations presented above argued in favor of a bad prognostic value for *AKT3* expression. Indeed, the ELN-2017 favorable group expresses a lower amount of *AKT3*. Also, the level of *AKT3* expression is lower in leukemic blasts harboring *NPM1* mutations or the *RUNX1-RUNX1T1* translocation (which are both of better prognosis), but higher in samples harboring *RUNX1* mutations (which are of bad prognosis). To visualize the prognostic impact of expressions of the three *AKTs*, the patient overall survivals were first evaluated by Kaplan-Meier curves using the BEAT-AML dataset which contains 672 AML samples. To avoid potential bias in data interpretation, we removed here the samples that were not collected at diagnosis but later after the first line of therapy, those presenting with a myelodysplastic syndrome

(MDS) or a myeloproliferative neoplasm (MPN) and the samples from patients who could benefit from a transplantation (either bone marrow or cord blood cells engraftment). The Kaplan-Meier curves were finally plotted with such a homogeneous set of $n=239$ patients (**Fig. 6A**). Once more, *AKT3* behaved distinctly. Its expression level is highly correlated to a poor outcome ($p=0.0004$), while *AKT2* expression cannot distinguish two groups with a significant difference ($p=0.4550$). The data obtained with *AKT1* were very surprising. As opposed to *AKT3*, its expression level correlates significantly to a better survival ($p=0.004$).

Given these strong, yet opposite, predictive values of *AKT1* and *AKT3* expression levels, it was important to verify whether similar counterintuitive observations could be made in another consistent cohort. We therefore looked at the Leucegene public dataset encompassing 373 AML samples. As no clinical information can be obtained with the Leucegene cohort, we here downloaded the Kaplan-Meier overall survival curves as they appear online. We could not select the samples to provide information on a homogeneously treated set of patients. Yet, the results were very similar to those obtained with the BEAT-AML cohort. High *AKT3* expression appears as a powerful predictor of poor survival ($p=0.0000$), while in contrast *AKT1* shows as a strong predictor of better survival ($p=0.0012$), and no significant difference can be highlighted using *AKT2* expression as a parameter ($p=0.1648$) (**Fig. 6B**).

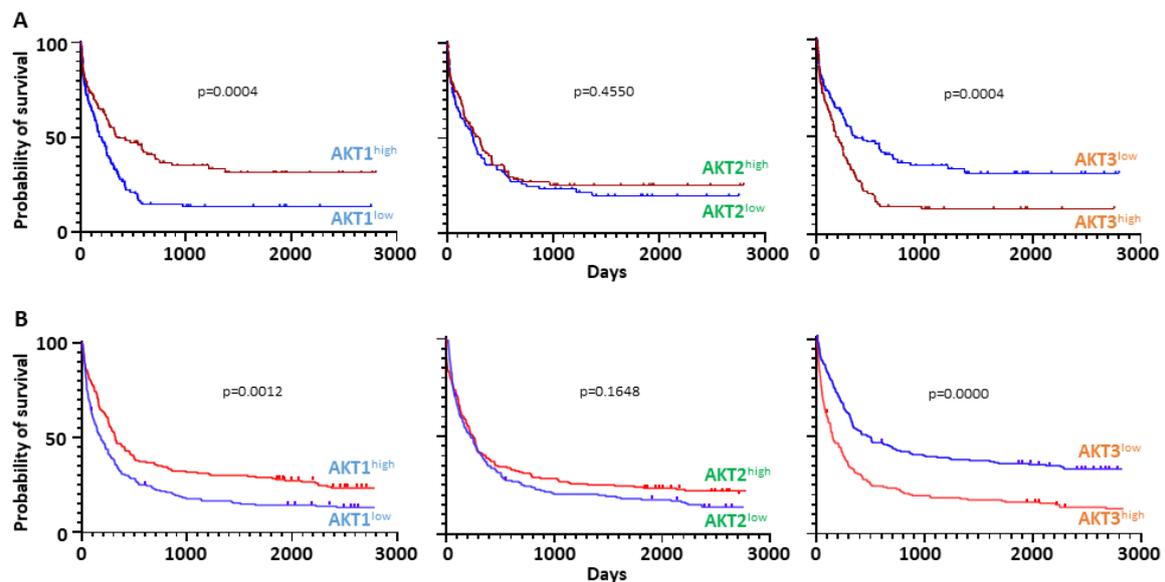


Figure 6. Kaplan-Meier curves showing the overall survival of AML patients as a function of expression each of the three *AKT* transcripts.

(A) Data obtained from the BEAT-AML cohort ($n=239$).

(B) Data obtained from the Leucegene cohort ($n=373$).

DISCUSSION

Prognostic values of AKT1 and AKT3.

That a higher expression of *AKT3* appears as a marker of bad prognosis is not surprising for a kinase lying in the PI3K-AKT-mTOR pathway so important for cancer cell growth and survival. What is quite counterintuitive, is the exact opposite prognostic value of *AKT1* expression. Our search in the literature of what kind of *AKT1 versus AKT3* kinase specific substrate(s) could provide a probable explanation remained unsuccessful. The growing list of such specific substrates will certainly help elucidating this mystery. Yet, this discrepancy highlights the need to search for specific inhibitors capable of discriminating each of the three AKT protein isoforms. Up to now, the vast majority of experimental works designed at describing the function of AKT in cancer cells was performed using panAKT inhibitors. If the three AKT kinases have distinct or even opposite effects on a biological function, as is the case for instance in vascular tumors where *AKT1* and *AKT3* kinases exhibit opposite effects on endothelial cell growth¹², this may have generated biases in data interpretation.

What could be the advantage for HSCs or leukemic blasts to express AKT3?

As said in the introduction, a recent report indicates that unlike *AKT1* and *AKT2*, the *AKT3* kinase locates at the nuclear envelope, facing the cytosol, and its protein serine/threonine kinase activity appears constitutively activated in a panel of established cancer cells¹⁰. Although no leukemic cell lines were included in this earlier study, one can speculate this is also the case in proliferating blasts. Proliferating cells such as self-renewing HSCs or leukemic blasts must consume a high level of nutrients and energy to produce a sufficient biomass before dividing into two equally sized daughter cells. As a sensor of nutrient availability, one important consequence of activation of the PI3K-AKT-mTOR pathway is the induction of cell growth, and particularly induction of the rate of protein synthesis which is the most energy-consuming cellular process, so as the mother cell attains a sufficient mass before dividing. Another specific feature described for the *AKT3* kinase is its function in mitochondrial biogenesis¹³, thereby controlling the production of cellular energy. One described mechanism whereby *AKT3* favors this process is via activation of export through the nuclear envelope (where *AKT3* protein lies) of one major regulator of mitochondrial biogenesis¹⁴. Thus, expressing a constitutively activated *AKT3* kinase would be a serious advantage for both HSCs and leukemic blasts.

Relationship between AKT3 and NPM1wt or NPM1c.

A recent report showed that NPM1wt and NPM1c proteins exhibit opposite effects on AKT kinase activation in leukemic blasts. Indeed, it was shown there that the NPM1c protein physically associates with AKT and antagonizes the inhibitory effect of NPM1wt on AKT phosphorylation. Interestingly, this leads to enhanced sensitivity of *NPM1c* leukemic blasts to AKT inhibitors¹⁵. However, in this report were used only anti-AKT and anti-phosphoAKT antibodies that cannot discriminate the three AKT protein isoforms (i.e. panAKT antibodies). Therefore, it is yet not known whether NPM1c interacts preferentially with one or another of the AKT kinases. This would be interesting to check. Our present data show that *AKT3* expression, but not that of *AKT1* or *AKT2*, is severely downregulated in *NPM1c* blasts. We can therefore speculate that, if AKT3 kinase is actually constitutively activated in leukemic cells, the downregulation of *AKT3* expression we see here in *NPM1c* blasts should be additive to the inhibitory effect of NPM1c protein on global AKT activity shown earlier. Such additive inhibitory effects may together contribute to the better survival of *NPM1c* patients. These data also further support the idea that *NPM1c* AML could be more sensitive to AKT inhibitors. What remains unresolved is whether and how the NPM1c protein could control the *AKT3* transcript amount, or whether these two events are solely concomitant with no causal link one to the other. This remains to be addressed experimentally.

Relationship between AKT3 and RUNX1wt, RUNX1mut or RUNX1-RUNX1T1.

Another striking observation in our study is the inverse correlations between elevated *AKT3* expression and *RUNX1mut* in one hand, and diminished *AKT3* expression and *RUNX1-RUNX1T1* translocation in the other hand, as compared to *RUNX1wt* samples. Here again, whether and how molecularly the two mutated or translocated *RUNX1* variants could control *AKT3* transcript expression in opposite ways, or whether these events are solely correlated with no causal connection, remains unknown. This merits further investigation aimed at testing experimentally whether the *RUNX1* transcription factor or its mutant or translocated counterparts interacts with the *AKT3* gene locus to directly control or not its transcription. In a clinical perspective, the very low expression of *AKT3* in *RUNX1-RUNX1T1* AML suggests it would be preferable to target *AKT1* or *AKT2* kinase in this leukemic entity. This is consistent with an earlier report which indicated that *RUNX1-RUNX1T1* blasts harbor an activated *AKT1* kinase and are specifically sensitive to *AKT1* inhibition both *in vitro* and *in vivo* settings¹⁶.

REFERENCES

- 1 Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Larson RA, Levine RL, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz M, Sierra J, Tallman MS, Tien HF, Wei AH, Löwenberg B, Bloomfield CD. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017 Jan 26;129(4):424-447. doi: 10.1182/blood-2016-08-733196.
- 2 Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Godley LA, Hasserjian RP, Larson RA, Levine RL, Miyazaki Y, Niederwieser D, Ossenkoppele G, Röllig C, Sierra J, Stein EM, Tallman MS, Tien HF, Wang J, Wierzbowska A, Löwenberg B. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 2022 Sep 22;140(12):1345-1377. doi: 10.1182/blood.2022016867.
- 3 Faridi J, Fawcett J, Wang L, Roth RA. Akt promotes increased mammalian cell size by stimulating protein synthesis and inhibiting protein degradation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003 Nov;285(5):E964-72. doi: 10.1152/ajpendo.00239.2003.
- 4 Smit DJ, Jücker M. AKT Isoforms as a Target in Cancer and Immunotherapy. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2022;436:409-436. doi: 10.1007/978-3-031-06566-8_18.
- 5 Degan SE, Gelman IH. Emerging Roles for AKT Isoform Preference in Cancer Progression Pathways. *Mol Cancer Res*. 2021 Aug;19(8):1251-1257. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-20-1066.
- 6 Wainstein E, Maik-Rachline G, Blenis J, Seger R. AKTs do not translocate to the nucleus upon stimulation but AKT3 can constitutively signal from the nuclear envelope. *Cell Rep*. 2022 Dec 6;41(10):111733. doi: 10.1016/j.celrep.2022.111733.
- 7 Mure H, Matsuzaki K, Kitazato KT, Mizobuchi Y, Kuwayama K, Kageji T, Nagahiro S. Akt2 and Akt3 play a pivotal role in malignant gliomas. *Neuro Oncol*. 2010 Mar;12(3):221-32. doi: 10.1093/neuonc/nop026.
- 8 De Clara E, Gourvest M, Ma H, Vergez F, Tosolini M, Dejean S, Demur C, Delabesse E, Recher C, Touriol C, Martelli MP, Falini B, Brousset P, Bousquet M. Long non-coding RNA expression profile in

- cytogenetically normal acute myeloid leukemia identifies a distinct signature and a new biomarker in NPM1-mutated patients. *Haematologica*. 2017 Oct;102(10):1718-1726. doi: 10.3324/haematol.2017.171645.
- 9** Bagger FO, Sasivarevic D, Sohi SH, Laursen LG, Pundhir S, S nderby CK, Winther O, Rapin N, Porse BT. BloodSpot: a database of gene expression profiles and transcriptional programs for healthy and malignant haematopoiesis. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jan 4;44(D1):D917-24. doi: 10.1093/nar/gkv1101.
- 10** Tyner JW, Tognon CE, Bottomly D, Wilmot B, Kurtz SE, Savage SL, Long N, Schultz AR, Traer E, Abel M, Agarwal A, Blucher A, Borate U, Bryant J, Burke R, Carlos A, Carpenter R, Carroll J, Chang BH, Coblenz C, d'Almeida A, Cook R, Danilov A, Dao KT, Degnin M, Devine D, Dibb J, Edwards DK 5th, Eide CA, English I, Glover J, Henson R, Ho H, Jemal A, Johnson K, Johnson R, Junio B, Kaempf A, Leonard J, Lin C, Liu SQ, Lo P, Loriaux MM, Luty S, Macey T, MacManiman J, Martinez J, Mori M, Nelson D, Nichols C, Peters J, Ramsdill J, Rofelty A, Schuff R, Searles R, Segerdell E, Smith RL, Spurgeon SE, Sweeney T, Thapa A, Visser C, Wagner J, Watanabe-Smith K, Werth K, Wolf J, White L, Yates A, Zhang H, Cogle CR, Collins RH, Connolly DC, Deininger MW, Drusbosky L, Hourigan CS, Jordan CT, Kropf P, Lin TL, Martinez ME, Medeiros BC, Pallapati RR, Pollyea DA, Swords RT, Watts JM, Weir SJ, Wiest DL, Winters RM, McWeeney SK, Druker BJ. Functional genomic landscape of acute myeloid leukaemia. *Nature*. 2018 Oct;562(7728):526-531. doi: 10.1038/s41586-018-0623-z.
- 11** Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, Pimentel H, Salzberg SL, Rinn JL, Pachter L. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc*. 2012 Mar 1;7(3):562-78. doi: 10.1038/nprot.2012.016.
- 12** Phung TL, Du W, Xue Q, Ayyaswamy S, Gerald D, Antonello Z, Nhek S, Perruzzi CA, Acevedo I, Ramanna-Valmiki R, Rodriguez-Waitkus P, Enayati L, Hochman ML, Lev D, Geeganage S, Benjamin LE. Akt1 and akt3 exert opposing roles in the regulation of vascular tumor growth. *Cancer Res*. 2015 Jan 1;75(1):40-50. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2961.
- 13** Wright GL, Maroulakou IG, Eldridge J, Liby TL, Sridharan V, Tsihchlis PN, Muise-Helmericks RC. VEGF stimulation of mitochondrial biogenesis: requirement of AKT3 kinase. *FASEB J*. 2008 Sep;22(9):3264-75. doi: 10.1096/fj.08-106468.

- 14 Corum DG, Tsihchlis PN, Muise-Helmericks RC. AKT3 controls mitochondrial biogenesis and autophagy via regulation of the major nuclear export protein CRM-1. *FASEB J*. 2014 Jan;28(1):395-407. doi: 10.1096/fj.13-235382.
- 15 Ren Z, Shrestha M, Sakamoto T, Melkman T, Meng L, Cairns RA, Zacksenhaus E, Mak TW, Stambolic V, Minden MD, Wang JA. Opposing effects of NPM1wt and NPM1c mutants on AKT signaling in AML. *Leukemia*. 2020 Apr;34(4):1172-1176. doi: 10.1038/s41375-019-0621-7.
- 16 Wang L, Man N, Sun XJ, Tan Y, García-Cao M, Liu F, Hatlen M, Xu H, Huang G, Mattlin M, Mehta A, Rampersaud E, Benezra R, Nimer SD. Regulation of AKT signaling by Id1 controls t(8;21) leukemia initiation and progression. *Blood*. 2015 Jul 30;126(5):640-50. doi: 10.1182/blood-2015-03-635532.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.P. wrote the manuscript. C.R, M.B. and S.P. contributed to the study's design, conception and analysis of the data. E.C, C.S., R.P, C.M., C.B. and M.B. prepared the material, collected and contributed to analyses. F.M and C.T. commented on and edited the manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

Some of the results obtained in this publication are based upon data generated by the Leucegene group primarily located at IRIC in Montreal, Canada and supported by Genome Canada and Genome Québec. This data was made possible through human AML specimens provided by the BCLQ, Montreal, Canada.

FUNDING

The study was supported by the INSERM, Labex Toucan, Fondation Leucémie Espoir, Ligue Régionale Contre le Cancer and Cancéropôle Grand Sud-Ouest. E.C. was supported by Ligue Nationale Contre le Cancer, Société Française d'Hématologie and Labex Toucan. C.S. was supported by Fondation Toulouse Cancer Santé, Région Occitanie and Fondation pour la Recherche Médicale. R.P. was supported by Ministère de l'Enseignement Supérieur et de La Recherche.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY

The dataset generated during this study are available upon reasonable request to the corresponding author.

Discussion générale

De nombreuses altérations génétiques conduisent au développement de la LAM via la dérégulation de l'expression génique et de l'activité de protéines clés. Cela conduit à une altération de nombreuses fonctions biologiques et se répercute sur les facteurs d'initiation de la traduction ainsi que sur leurs régulateurs. Nos recherches ont mis en évidence l'implication de facteurs d'initiation de la traduction dans l'hématopoïèse normale et dans la LAM.

L'expression d'eIF4E3 est faible dans les cellules souches et les précurseurs hématopoïétiques. Elle est cependant élevée dans les monocytes ce qui suggérait son implication soit dans la différenciation monocyttaire soit dans la fonction terminale des monocytes. Nos expériences de perte de fonction (si-RNA contre eIF4E3) au cours de la différenciation de cellules CD34+ (un ensemble de cellules souches et de cellules progénitrices) n'a révélé qu'un modeste ralentissement de la différenciation en monocytes (<10%). Ces données suggèrent qu'au cours de la différenciation normale, l'expression d'eIF4E3 n'est peut-être pas requise pour engager la différenciation des cellules CD34+ en monocytes. On peut donc supposer qu'eIF4E3 participerait plutôt à la fonction biologique terminale des monocytes.

L'utilisation d'un si-RNA dès l'engagement des cellules en différenciation diminue bien l'expression d'eIF4E3, mais n'a qu'un faible impact sur la différenciation. On pourrait supposer que ce facteur n'est pas « nécessaire » pour engager la différenciation des cellules en monocytes. La diminution d'expression d'eIF4E3 (si-ARN) plus tardivement au cours de la différenciation, c'est-à-dire à un moment où son expression est essentielle, permettrait peut-être de ralentir de façon plus importante la différenciation des cellules en monocytes. Afin de vérifier si le facteur eIF4E3 participe tardivement à la différenciation monocyttaire, il serait intéressant de ralentir son expression plus tard dans le processus de différenciation.

Au vu des données d'expression d'eIF4E3 dans la différenciation myéloïde normale, on pouvait s'attendre à ce que l'expression d'eIF4E3 soit faible dans les blastes leucémiques qui sont bloqués à des stades intermédiaires de différenciation. L'analyse d'échantillons issus de plusieurs centaines de patients révèle que ce n'est pas le cas, avec au contraire une grande majorité d'échantillons leucémiques exprimant eIF4E3 à un niveau comparable à celui mesuré dans les monocytes. Cette observation n'est pas en accord avec l'unique article relatant

l'expression d'eIF4E3 dans la LAM et indiquant préférentiellement une sous-expression du facteur eIF4E3 dans les blastes leucémiques ²⁴⁷. Cet article propose aussi qu'eIF4E3 jouerait un rôle de suppresseur de tumeur. Cependant, ces conclusions ont été tirées suite à l'analyse de seulement 3 échantillons leucémiques ²⁴⁷. Nous proposons donc une hypothèse alternative selon laquelle eIF4E3 est surexprimé dans les blastes leucémiques comparés à leurs équivalents intermédiaires de différenciation, et pourrait alors jouer un rôle oncogénique aux côtés d'eIF4E1. Le facteur eIF4E1 étant en quantité limitante dans les cellules (voir introduction), l'action synergique d'eIF4E3 et d'eIF4E1 pourrait alors favoriser la traduction d'un transcriptome oncogénique.

Les expériences de perte de fonction réalisées dans les lignées leucémiques établies et poussées en différenciation monocyttaire ont révélé que la diminution artificielle de l'expression d'eIF4E3 ralentissait significativement leur différenciation monocyttaire. Ce qui n'était pas le cas pour les cellules CD34+ normales (voir ci-dessus). Cette différence de fonction d'eIF4E3 dans les cellules leucémiques comparées aux cellules normales pourrait s'expliquer par un timing différent de l'expression d'eIF4E3. En effet, eIF4E3 n'apparaît que tardivement dans la différenciation normale, seulement après le passage des cellules par le stade progéniteur. Dans les blastes leucémiques, la surexpression d'eIF4E3 est donc plus « précoce » qu'attendue et pourrait alors contribuer à la régulation traductionnelle des ARNm codant des protéines requises pour leur différenciation.

De nombreuses études ont mis en évidence l'importance du facteur eIF4E1 dans la régulation de nombreuses fonctions biologiques. De plus, il est communément admis que la surexpression d'eIF4E1 est impliquée dans la prolifération et la croissance tumorale. Les facteurs d'initiation et notamment eIF4E1 sont régulés par de nombreux facteurs de transcription, des voies de signalisation (MAPK et PI3K/AKT/mTOR) et par bien d'autres acteurs.

Des facteurs de transcription (RUNX1, C/EBP α , c-myc..), des régulateurs épigénétiques (DNMT3A, TET2..) ou du métabolisme (IDH1/2) ou encore des facteurs d'épissage ²⁸⁹ (SRSF2, SF3B..) sont mutés dans la LAM. Les facteurs de transcription contrôlent l'expression génique, une dérégulation de ces facteurs conduit à la transcription de gènes de façon inappropriée et altère donc différentes fonctions biologiques. Pour exemple, les facteurs de transcription c-

myc²⁶⁴ ou encore C/EBP α ²⁶⁶ sont mutés dans la LAM et ont pour cible transcriptionnelle le facteur eIF4E1.

On peut donc émettre l'hypothèse que le facteur eIF4E3 est lui aussi régulé par différents facteurs de transcription. Les mutations de ces derniers auraient donc des conséquences sur ses niveaux d'expression et pourrait expliquer qu'il soit dérégulé chez les patients atteints de LAM.

De plus, les voies de signalisation (MAPK et PI3K/AKT/mTOR) contrôlent et régulent le complexe d'initiation de la traduction²³⁶. Or il est connu que les altérations de ces voies de signalisation et par conséquent leur hyperactivité sont impliquées dans le développement de nombreux cancer. Plusieurs mutations retrouvées dans la LAM (par exemple les mutations de FLT3, KIT, NRAS, KRAS, PTEN...) sont à l'origine d'une activation exacerbée des voies de signalisation. Bien que le facteur eIF4E3 échappe à la régulation de la kinase MNK par l'absence de la sérine 209, il est essentiel de comprendre comment ce facteur est régulé au sein du complexe d'initiation de la traduction par les voies de signalisation. L'absence de connaissance sur le facteur d'initiation eIF4E3 rend d'autant plus compliqué l'identification des mécanismes de régulation de ce dernier.

Nous avons montré qu'eIF4E3 ne se liant pas aux 4E-BPs (une cible majeure de mTOR) participe à la résistance des blastes leucémiques aux inhibiteurs de mTOR en favorisant la survie et prolifération cellulaire. A l'heure actuelle nous ne connaissons pas par quel mécanisme en aval, ce processus se met en place. Mais nous pouvons supposer que la dérégulation des niveaux d'expression d'eIF4E3 participe à la traduction d'ARNm de façon inappropriée. Par analogie avec la régulation du facteur d'initiation eIF4E1²⁷⁵ au cours de la différenciation érythrocytaire, il semblerait que le timing et le niveau d'expression du facteur eIF4E3 soit important pour le bon déroulement des différents processus biologiques. Contrairement à eIF4E1, eIF4E3 échappe à la régulation du facteur 4E-BP. Cela facilite la liaison d'eIF4E3 à la coiffe des ARNm, d'autant plus quand l'expression d'eIF4E3 est élevée dans les blastes leucémiques, favorisant un traductome oncogénique. Cela pourrait expliquer les réponses cliniques mitigées obtenues dans notre centre avec les inhibiteurs de mTOR²⁷⁷.

Afin de bloquer l'hyperactivation des voies de signalisation et la phosphorylation exacerbée d'eIF4E1, l'utilisation d'un inhibiteur de MNK semblait être un bon candidat^{290,281}. En effet,

l'inhibition de la phosphorylation d'eIF4E1 faciliterait une traduction cap-dépendante d'eIF4E3 ²⁹¹. Cependant les résultats obtenus avec un inhibiteur spécifique de la kinase MNK n'a pas eu les effets attendus, à savoir une potentialisation de la différenciation cellulaire. Pourtant de nombreuses études rapportent le potentiel thérapeutique des inhibiteurs de MNK dans le traitement des LAM. Certaines études démontrent également un bénéfice en utilisant simultanément des inhibiteurs de mTOR et de MNK ²⁹² afin de limiter une prolifération aberrante. Il est alors légitime de questionner si l'utilisation de ces inhibiteurs est réellement une bonne stratégie, au vu de nos différences de résultats. Les inhibiteurs développés sont-ils spécifiques seulement de la kinase MNK ou bien agissent-ils également sur d'autres kinases et pourraient expliquer les effets divergents ? Les conditions d'utilisation de cet inhibiteur dans nos expérimentations n'étaient peut-être pas les bonnes. Il est envisageable que les inhibiteurs ne potentialisent pas la différenciation monocyttaire mais limite la prolifération cellulaire. Nos résultats n'étant que préliminaires, ils mériteraient d'autres expérimentations comme une analyse de la prolifération ou la combinaison avec d'autres traitements (chimiothérapie, agent différenciant). D'autant plus que l'utilisation d'agents différenciants (vitamine C et D) en association avec la chimiothérapie semble démontrer un réel bénéfice chez les patients atteints de LAM ¹⁷².

Un autre facteur AKT, une kinase située dans la voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR, semble être dérégulé dans les LAM. La signalisation qui en découle contrôle le complexe d'initiation de la traduction et régule la croissance et la survie des cellules. La dérégulation de cette voie de signalisation favorise la croissance tumorale ²⁹³. Nos premières données préliminaires semblent démontrer un rôle distinct entre les isoformes de AKT. En effet, une forte expression d'AKT3 est associée à une mauvaise survie des patients. De façon surprenante, les patients avec une forte expression d'AKT1 présentent une meilleure survie que ceux avec une faible expression. Etant donné que l'expression de AKT1 ou de AKT3 semble avoir un impact différent sur la survie, l'utilisation d'inhibiteurs d'AKT pourrait être intéressante si ces inhibiteurs sont spécifiques de chacun des isoformes. Ces données préliminaires donnent un axe de recherche intéressant tant sur la compréhension et le rôle de ces trois isoformes dans les blastes leucémiques que sur le développement de nouvelles thérapies ciblées.

Dans l'ensemble, ces travaux mettent en évidence l'implication des facteurs d'initiation de la traduction ainsi que de leurs régulateurs dans le développement des LAM. Le complexe

d'initiation de la traduction est au centre de la régulation de la synthèse protéique et toute dérégulation participe aux processus oncogéniques.

Conclusion générale

Pour conclure, nos résultats démontrent l'implication des facteurs d'initiation de la traduction (eIF4E1 et eIF4E3), ainsi que des acteurs des voies de signalisation (PI3K/AKT/mTOR et MAPK/MNK) dans la leucémogénèse.

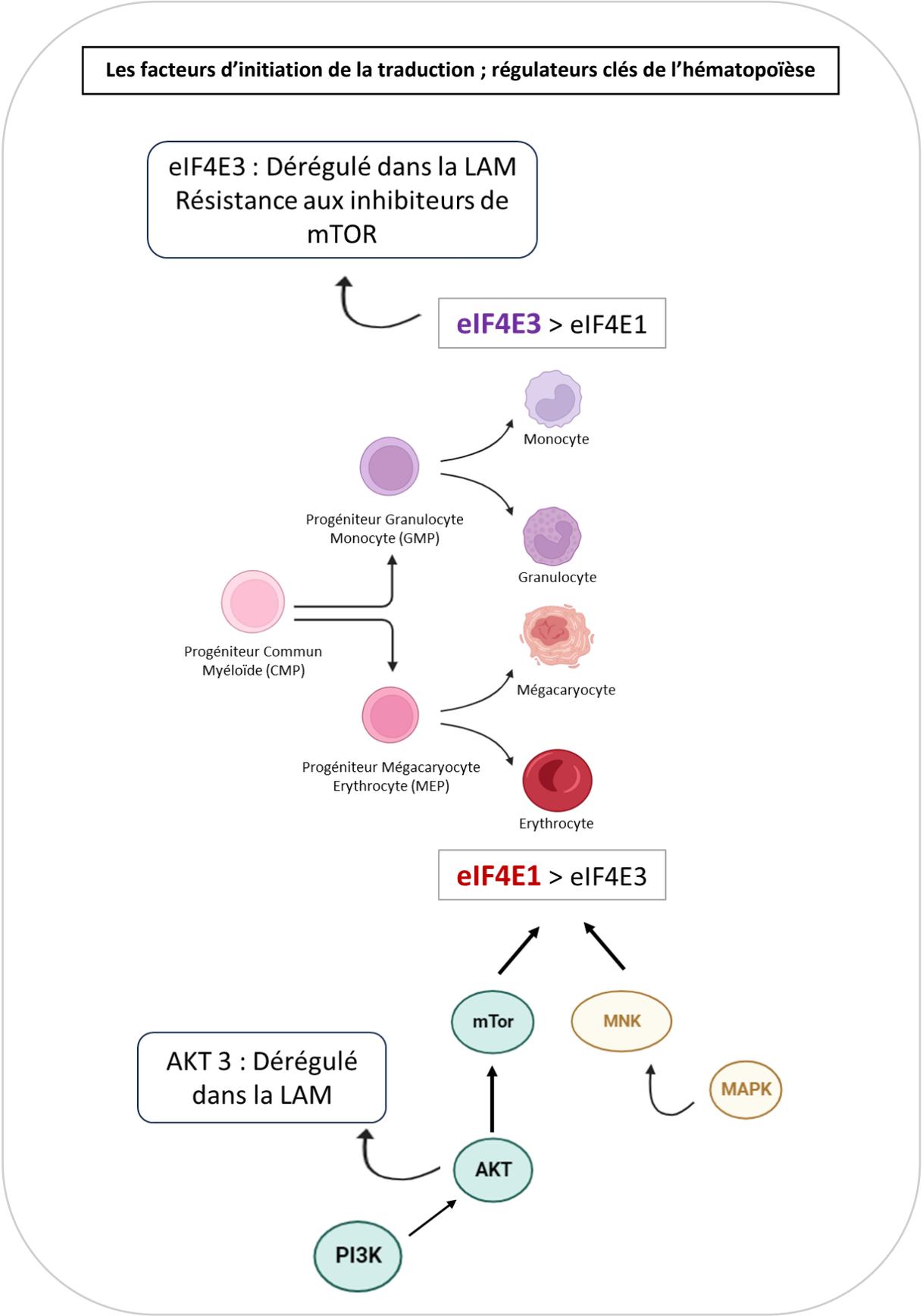
Le facteur d'initiation de la traduction eIF4E3 participe à la différenciation des cellules hématopoïétiques en monocytes. Chez les patients atteints de LAM, son expression variable et dérégulée semble participer aux processus oncogéniques. De plus une forte expression d'eIF4E3 participe à la résistance des blastes leucémiques aux inhibiteurs de mTOR. L'analyse du transcriptome d'eIF4E3 et d'eIF4E1 est essentielle afin d'identifier les ARNm cibles traduits par ces deux facteurs. Cela pourrait également suggérer des ARNm dont les protéines seraient potentiellement impliquées dans le développement des LAM.

La kinase MNK régule le complexe d'initiation de la traduction et participe à la phosphorylation d'eIF4E1. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de MNK en combinaison avec un agent différenciant ne potentialise pas la différenciation monocyttaire dans les lignées de LAM. Cependant l'utilisation d'inhibiteur multi-kinase favorise la différenciation des cellules. Cela laisse penser que la potentialisation de la différenciation cellulaire n'est pas seulement due à la diminution de la phosphorylation du facteur de traduction eIF4E1 mais aussi à l'inhibition d'autres kinases.

Dans l'hématopoïèse normale, le facteur AKT3 est préférentiellement exprimé dans les cellules souches hématopoïétiques alors que AKT1 s'exprime au cours de la différenciation monocyttaire. Chez les patients atteints de LAM, l'expression de AKT3 est beaucoup plus variable que celle d'AKT1. L'expression de AKT3 dans les LAM est associée à des altérations génétiques conférant un pronostic plus ou moins favorable. D'après ces données, une forte expression d'AKT3 est associée à un mauvais pronostic et à une faible survie. Alors qu'une expression élevée de AKT1 démontre un meilleur pronostic pour les patients.

L'ensemble de ces résultats est un premier pas dans la compréhension et la caractérisation du facteur d'initiation de la traduction eIF4E3. Comprendre les fonctions biologiques de ce

facteur impliqué dans la différenciation hématopoïétique devient essentiel et pourrait permettre une meilleure prise en charge thérapeutique des patients.



Références

1. Pinho, S., and Frenette, P.S. (2019). Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *20*, 303–320. [10.1038/s41580-019-0103-9](https://doi.org/10.1038/s41580-019-0103-9).
2. Till, J.E., and McCULLOCH, E.A. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* *14*, 213–222.
3. Becker, A.J., McCULLOCH, E.A., and Till, J.E. (1963). Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived from Transplanted Mouse Marrow Cells. *Nature* *197*, 452–454. [10.1038/197452a0](https://doi.org/10.1038/197452a0).
4. Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* *4*, 7–25.
5. Wilson, A., and Trumpp, A. (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 93–106. [10.1038/nri1779](https://doi.org/10.1038/nri1779).
6. Wilson, A., Oser, G.M., Jaworski, M., Blanco-Bose, W.E., Laurenti, E., Adolphe, C., Essers, M.A., Macdonald, H.R., and Trumpp, A. (2007). Dormant and Self-Renewing Hematopoietic Stem Cells and Their Niches. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1106*, 64–75. [10.1196/annals.1392.021](https://doi.org/10.1196/annals.1392.021).
7. Wilson, A., Laurenti, E., Oser, G., van der Wath, R.C., Blanco-Bose, W., Jaworski, M., Offner, S., Dunant, C.F., Eshkind, L., Bockamp, E., et al. (2008). Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* *135*, 1118–1129. [10.1016/j.cell.2008.10.048](https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.048).
8. Nilsson, S.K., Johnston, H.M., and Coverdale, J.A. (2001). Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood* *97*, 2293–2299. [10.1182/blood.V97.8.2293](https://doi.org/10.1182/blood.V97.8.2293).
9. Orford, K.W., and Scadden, D.T. (2008). Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nat. Rev. Genet.* *9*, 115–128. [10.1038/nrg2269](https://doi.org/10.1038/nrg2269).

10. Seita, J., and Weissman, I.L. (2010). Hematopoietic Stem Cell: Self-renewal versus Differentiation. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2, 640–653. 10.1002/wsbm.86.
11. Roegiers, F., and Jan, Y.N. (2004). Asymmetric cell division. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 195–205. 10.1016/j.ceb.2004.02.010.
12. Congdon, K.L., and Reya, T. (2008). Divide and Conquer: How asymmetric division shapes cell fate in the hematopoietic system. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 302–307. 10.1016/j.coi.2008.05.003.
13. Rosenbauer, F., and Tenen, D.G. (2007). Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 105–117. 10.1038/nri2024.
14. Weissman, I.L. (2000). Stem Cells: Units of Development, Units of Regeneration, and Units in Evolution. *Cell* 100, 157–168. 10.1016/S0092-8674(00)81692-X.
15. Morrison, S.J., and Weissman, I.L. (1994). The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1, 661–673. 10.1016/1074-7613(94)90037-X.
16. Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193–197. 10.1038/35004599.
17. Kondo, M., Weissman, I.L., and Akashi, K. (1997). Identification of Clonogenic Common Lymphoid Progenitors in Mouse Bone Marrow. *Cell* 91, 661–672. 10.1016/S0092-8674(00)80453-5.
18. Laurenti, E., and Göttgens, B. (2018). From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature* 553, 418–426. 10.1038/nature25022.
19. Karamitros, D., Stoilova, B., Aboukhalil, Z., Hamey, F., Reinisch, A., Samitsch, M., Quek, L., Otto, G., Repapi, E., Doondea, J., et al. (2018). Heterogeneity of human lymphomyeloid progenitors at the single cell level. *Nat. Immunol.* 19, 85–97. 10.1038/s41590-017-0001-2.

20. Velten, L., Haas, S.F., Raffel, S., Blaszkiewicz, S., Islam, S., Hennig, B.P., Hirche, C., Lutz, C., Buss, E.C., Nowak, D., et al. (2017). Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process. *Nat. Cell Biol.* *19*, 271–281. 10.1038/ncb3493.
21. Rodriguez-Fraticelli, A.E., Wolock, S.L., Weinreb, C.S., Panero, R., Patel, S.H., Jankovic, M., Sun, J., Calogero, R.A., Klein, A.M., and Camargo, F.D. (2018). Clonal analysis of lineage fate in native haematopoiesis. *Nature* *553*, 212–216. 10.1038/nature25168.
22. Cabezas-Wallscheid, N., Klimmeck, D., Hansson, J., Lipka, D.B., Reyes, A., Wang, Q., Weichenhan, D., Lier, A., von Paleske, L., Renders, S., et al. (2014). Identification of Regulatory Networks in HSCs and Their Immediate Progeny via Integrated Proteome, Transcriptome, and DNA Methylation Analysis. *Cell Stem Cell* *15*, 507–522. 10.1016/j.stem.2014.07.005.
23. Pietras, E.M., Reynaud, D., Kang, Y.-A., Carlin, D., Calero-Nieto, F.J., Leavitt, A.D., Stuart, J.M., Göttgens, B., and Passegué, E. (2015). Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. *Cell Stem Cell* *17*, 35–46. 10.1016/j.stem.2015.05.003.
24. Adolfsson, J., Månsson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C.T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O.-J., Thoren, L.A.M., et al. (2005). Identification of Flt3⁺ Lympho-Myeloid Stem Cells Lacking Erythro-Megakaryocytic Potential: A Revised Road Map for Adult Blood Lineage Commitment. *Cell* *121*, 295–306. 10.1016/j.cell.2005.02.013.
25. Doulatov, S., Notta, F., Eppert, K., Nguyen, L.T., Ohashi, P.S., and Dick, J.E. (2010). Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat. Immunol.* *11*, 585–593. 10.1038/ni.1889.
26. Görgens, A., Radtke, S., Möllmann, M., Cross, M., Dürig, J., Horn, P.A., and Giebel, B. (2013). Revision of the Human Hematopoietic Tree: Granulocyte Subtypes Derive from Distinct Hematopoietic Lineages. *Cell Rep.* *3*, 1539–1552. 10.1016/j.celrep.2013.04.025.
27. Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E., and Dick, J.E. (2012). Hematopoiesis: A Human Perspective. *Cell Stem Cell* *10*, 120–136. 10.1016/j.stem.2012.01.006.

28. Kiel, M.J., Yilmaz, Ö.H., Iwashita, T., Yilmaz, O.H., Terhorst, C., and Morrison, S.J. (2005). SLAM Family Receptors Distinguish Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Reveal Endothelial Niches for Stem Cells. *Cell* *121*, 1109–1121. 10.1016/j.cell.2005.05.026.
29. Mohrin, M., Bourke, E., Alexander, D., Warr, M.R., Barry-Holson, K., Le Beau, M.M., Morrison, C.G., and Passegué, E. (2010). Hematopoietic stem cell quiescence promotes error prone DNA repair and mutagenesis. *Cell Stem Cell* *7*, 174–185. 10.1016/j.stem.2010.06.014.
30. Cabezas-Wallscheid, N., Buettner, F., Sommerkamp, P., Klimmeck, D., Ladel, L., Thalheimer, F.B., Pastor-Flores, D., Roma, L.P., Renders, S., Zeisberger, P., et al. (2017). Vitamin A-Retinoic Acid Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Dormancy. *Cell* *169*, 807-823.e19. 10.1016/j.cell.2017.04.018.
31. Nakamura-Ishizu, A., Takizawa, H., and Suda, T. (2014). The analysis, roles and regulation of quiescence in hematopoietic stem cells. *Development* *141*, 4656–4666. 10.1242/dev.106575.
32. Simsek, T., Kocabas, F., Zheng, J., Deberardinis, R.J., Mahmoud, A.I., Olson, E.N., Schneider, J.W., Zhang, C.C., and Sadek, H.A. (2010). The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell* *7*, 380–390. 10.1016/j.stem.2010.07.011.
33. Ho, T.T., Warr, M.R., Adelman, E.R., Lansinger, O.M., Flach, J., Verovskaya, E.V., Figueroa, M.E., and Passegué, E. (2017). Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells. *Nature* *543*, 205–210. 10.1038/nature21388.
34. Mortensen, M., Watson, A.S., and Simon, A.K. (2011). Lack of autophagy in the hematopoietic system leads to loss of hematopoietic stem cell function and dysregulated myeloid proliferation. *Autophagy* *7*, 1069–1070. 10.4161/auto.7.9.15886.
35. Yu, W.-M., Liu, X., Shen, J., Jovanovic, O., Pohl, E.E., Gerson, S.L., Finkel, T., Broxmeyer, H.E., and Qu, C.-K. (2013). Metabolic regulation by the mitochondrial phosphatase PTPMT1 is required for hematopoietic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell* *12*, 62–74. 10.1016/j.stem.2012.11.022.

36. Farlik, M., Halbritter, F., Müller, F., Choudry, F.A., Ebert, P., Klughammer, J., Farrow, S., Santoro, A., Ciaurro, V., Mathur, A., et al. (2016). DNA Methylation Dynamics of Human Hematopoietic Stem Cell Differentiation. *Cell Stem Cell* *19*, 808–822. 10.1016/j.stem.2016.10.019.
37. Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Takubo, K., Matsuoka, S., Miyamoto, K., Ohmura, M., Naka, K., Hosokawa, K., Ikeda, Y., et al. (2006). Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* *12*, 446–451. 10.1038/nm1388.
38. Sedelnikova, O.A., Redon, C.E., Dickey, J.S., Nakamura, A.J., Georgakilas, A.G., and Bonner, W.M. (2010). Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. *Mutat. Res.* *704*, 152–159. 10.1016/j.mrrev.2009.12.005.
39. Laurenti, E., Frelin, C., Xie, S., Ferrari, R., Dunant, C.F., Zandi, S., Neumann, A., Plumb, I., Doulatov, S., Chen, J., et al. (2015). CDK6 Levels Regulate Quiescence Exit in Human Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* *16*, 302–313. 10.1016/j.stem.2015.01.017.
40. Olson, O.C., Kang, Y.-A., and Passegué, E. (2020). Normal Hematopoiesis Is a Balancing Act of Self-Renewal and Regeneration. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *10*, a035519. 10.1101/cshperspect.a035519.
41. Anthony, B.A., and Link, D.C. (2014). Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends Immunol.* *35*, 32–37. 10.1016/j.it.2013.10.002.
42. Thorén, L.A., Liuba, K., Bryder, D., Nygren, J.M., Jensen, C.T., Qian, H., Antonchuk, J., and Jacobsen, S.-E.W. (2008). Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 2045–2053. 10.4049/jimmunol.180.4.2045.
43. Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., and Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches. *Immunity* *25*, 977–988. 10.1016/j.immuni.2006.10.016.
44. Jung, Y., Wang, J., Schneider, A., Sun, Y.-X., Koh-Paige, A.J., Osman, N.I., McCauley, L.K., and Taichman, R.S. (2006). Regulation of SDF-1 (CXCL12) production by osteoblasts; a

- possible mechanism for stem cell homing. *Bone* 38, 497–508. 10.1016/j.bone.2005.10.003.
45. Arcangeli, M.-L., Frontera, V., Bardin, F., Obrados, E., Adams, S., Chabannon, C., Schiff, C., Mancini, Stephane.J.C., Adams, R.H., and Aurrand-Lions, M. (2011). JAM-B regulates maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow. *Blood* 118, 4609–4619. 10.1182/blood-2010-12-323972.
 46. Arcangeli, M.-L., Bardin, F., Frontera, V., Bidaut, G., Obrados, E., Adams, R.H., Chabannon, C., and Aurrand-Lions, M. (2014). Function of Jam-B/Jam-C interaction in homing and mobilization of human and mouse hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 32, 1043–1054. 10.1002/stem.1624.
 47. Henry, E., Barroca, V., Lopez, C.K., Aurrand-Lions, M., Lewandowski, D., Mercher, T., and Arcangeli, M.-L. (2021). JAM-C/Jam-C Expression Is Primarily Expressed in Mouse Hematopoietic Stem Cells. *HemaSphere* 5, e594. 10.1097/HS9.0000000000000594.
 48. Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., Ito, K., Koh, G.Y., and Suda, T. (2004). Tie2/Angiopoietin-1 Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence in the Bone Marrow Niche. *Cell* 118, 149–161. 10.1016/j.cell.2004.07.004.
 49. Yamazaki, S., Iwama, A., Takayanagi, S., Eto, K., Ema, H., and Nakauchi, H. (2009). TGF-beta as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation. *Blood* 113, 1250–1256. 10.1182/blood-2008-04-146480.
 50. Yamazaki, S., Ema, H., Karlsson, G., Yamaguchi, T., Miyoshi, H., Shioda, S., Taketo, M.M., Karlsson, S., Iwama, A., and Nakauchi, H. (2011). Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell* 147, 1146–1158. 10.1016/j.cell.2011.09.053.
 51. Taichman, R.S., and Emerson, S.G. (1994). Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 179, 1677–1682. 10.1084/jem.179.5.1677.

52. Boettcher, S., Gerosa, R.C., Radpour, R., Bauer, J., Ampenberger, F., Heikenwalder, M., Kopf, M., and Manz, M.G. (2014). Endothelial cells translate pathogen signals into G-CSF-driven emergency granulopoiesis. *Blood* *124*, 1393–1403. 10.1182/blood-2014-04-570762.
53. Ogawa, M. (1993). Differentiation and Proliferation of Hematopoietic Stem Cells. *Blood* *81*, 2844–2853. 10.1182/blood.V81.11.2844.2844.
54. Tokoyoda, K., Egawa, T., Sugiyama, T., Choi, B.-I., and Nagasawa, T. (2004). Cellular Niches Controlling B Lymphocyte Behavior within Bone Marrow during Development. *Immunity* *20*, 707–718. 10.1016/j.immuni.2004.05.001.
55. Akashi, K., Kondo, M., and Weissman, I.L. (1998). Role of interleukin-7 in T-cell development from hematopoietic stem cells. *Immunol. Rev.* *165*, 13–28. 10.1111/j.1600-065X.1998.tb01226.x.
56. Muller-Sieburg, C.E., Cho, R.H., Karlsson, L., Huang, J.-F., and Sieburg, H.B. (2004). Myeloid-biased hematopoietic stem cells have extensive self-renewal capacity but generate diminished lymphoid progeny with impaired IL-7 responsiveness. *Blood* *103*, 4111–4118. 10.1182/blood-2003-10-3448.
57. Paul, F., Arkin, Y., Giladi, A., Jaitin, D.A., Kenigsberg, E., Keren-Shaul, H., Winter, D., Lara-Astiaso, D., Gury, M., Weiner, A., et al. (2015). Transcriptional Heterogeneity and Lineage Commitment in Myeloid Progenitors. *Cell* *163*, 1663–1677. 10.1016/j.cell.2015.11.013.
58. Matsumoto, A., Takeishi, S., Kanie, T., Susaki, E., Onoyama, I., Tateishi, Y., Nakayama, K., and Nakayama, K.I. (2011). p57 is required for quiescence and maintenance of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* *9*, 262–271. 10.1016/j.stem.2011.06.014.
59. Tothova, Z., Kollipara, R., Huntly, B.J., Lee, B.H., Castrillon, D.H., Cullen, D.E., McDowell, E.P., Lazo-Kallanian, S., Williams, I.R., Sears, C., et al. (2007). FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell* *128*, 325–339. 10.1016/j.cell.2007.01.003.

60. Miyamoto, K., Araki, K.Y., Naka, K., Arai, F., Takubo, K., Yamazaki, S., Matsuoka, S., Miyamoto, T., Ito, K., Ohmura, M., et al. (2007). Foxo3a Is Essential for Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool. *Cell Stem Cell* *1*, 101–112. 10.1016/j.stem.2007.02.001.
61. Warr, M.R., Binnewies, M., Flach, J., Reynaud, D., Garg, T., Malhotra, R., Debnath, J., and Passegué, E. (2013). FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells. *Nature* *494*, 323–327. 10.1038/nature11895.
62. Cantor, A.B., and Orkin, S.H. (2002). Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene* *21*, 3368–3376. 10.1038/sj.onc.1205326.
63. Graf, T., and Enver, T. (2009). Forcing cells to change lineages. *Nature* *462*, 587–594. 10.1038/nature08533.
64. Dahl, R., Walsh, J.C., Lancki, D., Laslo, P., Iyer, S.R., Singh, H., and Simon, M.C. (2003). Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBP α ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat. Immunol.* *4*, 1029–1036. 10.1038/ni973.
65. Hohaus, S., Petrovick, M.S., Voso, M.T., Sun, Z., Zhang, D.E., and Tenen, D.G. (1995). PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 5830–5845. 10.1128/MCB.15.10.5830.
66. Smith, L.T., Hohaus, S., Gonzalez, D.A., Dziennis, S.E., and Tenen, D.G. (1996). PU.1 (Spi-1) and C/EBP α Regulate the Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptor Promoter in Myeloid Cells. *Blood* *88*, 1234–1247. 10.1182/blood.V88.4.1234.bloodjournal8841234.
67. Zhang, D.E., Hetherington, C.J., Chen, H.M., and Tenen, D.G. (1994). The macrophage transcription factor PU.1 directs tissue-specific expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 373–381. 10.1128/mcb.14.1.373-381.1994.

68. Tenen, D.G., Hromas, R., Licht, J.D., and Zhang, D.-E. (1997). Transcription Factors, Normal Myeloid Development, and Leukemia. *Blood* 90, 489–519. 10.1182/blood.V90.2.489.
69. Kitajima, K., Tanaka, M., Zheng, J., Yen, H., Sato, A., Sugiyama, D., Umehara, H., Sakai, E., and Nakano, T. (2006). Redirecting differentiation of hematopoietic progenitors by a transcription factor, GATA-2. *Blood* 107, 1857–1863. 10.1182/blood-2005-06-2527.
70. Vegiopoulos, A., García, P., Emambokus, N., and Frampton, J. (2006). Coordination of erythropoiesis by the transcription factor c-Myb. *Blood* 107, 4703–4710. 10.1182/blood-2005-07-2968.
71. Wang, X., Angelis, N., and Thein, S.L. (2018). MYB - A regulatory factor in hematopoiesis. *Gene* 665, 6–17. 10.1016/j.gene.2018.04.065.
72. Starck, J., Cohet, N., Gonnet, C., Sarrazin, S., Doubeikovskaia, Z., Doubeikovski, A., Verger, A., Duterque-Coquillaud, M., and Morle, F. (2003). Functional Cross-Antagonism between Transcription Factors FLI-1 and EKLf. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1390–1402. 10.1128/MCB.23.4.1390-1402.2003.
73. Ossipow, V., Descombes, P., and Schibler, U. (1993). CCAAT/enhancer-binding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8219–8223.
74. Tenen, D.G. (2003). Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat. Rev. Cancer* 3, 89–101. 10.1038/nrc989.
75. Prada-Arismendy, J., Arroyave, J.C., and Röthlisberger, S. (2017). Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. *Blood Rev.* 31, 63–76. 10.1016/j.blre.2016.08.005.
76. Le guyarder -Peyrou, S., Defossez, G., Dantony, E., Mounier, M., Cornet, E., Uhry, Z., Cowpli-Bony, A., Maynadié, M., Troussard, X., Delafosse, P., et al. (2019). Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Volume 2 – Hémopathies malignes. Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim.

77. Miranda-Filho, A., Piñeros, M., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Monnereau, A., and Bray, F. (2018). Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study. *Lancet Haematol.* 5, e14–e24. 10.1016/S2352-3026(17)30232-6.
78. Mounier, M., Maynadié, M., Troussard, X., Orazio, S., Monnereau, A., Cornet, E., Lecoffre, C., Lafay, L., Coureau, G., and Trétarre, B. (2020). Survie des personnes atteintes de cancer en France métropolitaine 1989-2018 - Leucémies aigües myeloïdes. <https://www.santepubliquefrance.fr/import/survie-des-personnes-atteintes-de-cancer-en-france-metropolitaine-1989-2018-leucemies-aigues-myeloides>.
79. Shallis, R.M., Weiss, J.J., Deziel, N.C., and Gore, S.D. (2021). A clandestine culprit with critical consequences: Benzene and acute myeloid leukemia. *Blood Rev.* 47, 100736. 10.1016/j.blre.2020.100736.
80. Adès, L., Itzykson, R., and Fenaux, P. (2014). Myelodysplastic syndromes. *The Lancet* 383, 2239–2252. 10.1016/S0140-6736(13)61901-7.
81. Dunbar, A.J., Rampal, R.K., and Levine, R. (2020). Leukemia secondary to myeloproliferative neoplasms. *Blood* 136, 61–70. 10.1182/blood.2019000943.
82. Boddu, P., Kantarjian, H.M., Garcia-Manero, G., Ravandi, F., Verstovsek, S., Jabbour, E., Borthakur, G., Konopleva, M., Bhalla, K.N., Daver, N., et al. (2017). Treated secondary acute myeloid leukemia: a distinct high-risk subset of AML with adverse prognosis. *Blood Adv.* 1, 1312–1323. 10.1182/bloodadvances.2017008227.
83. Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.-T., Flandrin, G., Galton, D. a. G., Gralnick, H.R., and Sultan, C. (1976). Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *Br. J. Haematol.* 33, 451–458. 10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x.
84. Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D. a. G., Gralnick, H.R., and Sultan, C. (1985). Proposed Revised Criteria for the Classification of Acute Myeloid Leukemia. *Ann. Intern. Med.* 103, 620–625. 10.7326/0003-4819-103-4-620.

85. Ladines-Castro, W., Barragán-Ibañez, G., Luna-Pérez, M.A., Santoyo-Sánchez, A., Collazo-Jaloma, J., Mendoza-García, E., and Ramos-Peñañiel, C.O. (2016). Morphology of leukaemias. *Rev. Médica Hosp. Gen. México* 79, 107–113. 10.1016/j.hgmx.2015.06.007.
86. Döhner, H., Estey, E.H., Amadori, S., Appelbaum, F.R., Büchner, T., Burnett, A.K., Dombret, H., Fenau, P., Grimwade, D., Larson, R.A., et al. (2010). Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 115, 453–474. 10.1182/blood-2009-07-235358.
87. Döhner, H., Estey, E., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F.R., Büchner, T., Dombret, H., Ebert, B.L., Fenau, P., Larson, R.A., et al. (2017). Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 129, 424–447. 10.1182/blood-2016-08-733196.
88. Döhner, H., Wei, A.H., Appelbaum, F.R., Craddock, C., DiNardo, C.D., Dombret, H., Ebert, B.L., Fenau, P., Godley, L.A., Hasserjian, R.P., et al. (2022). Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood* 140, 1345–1377. 10.1182/blood.2022016867.
89. Görgens, A., Radtke, S., Horn, P.A., and Giebel, B. (2013). New relationships of human hematopoietic lineages facilitate detection of multipotent hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Cycle* 12, 3478–3482. 10.4161/cc.26900.
90. Vardiman, J.W., Harris, N.L., and Brunning, R.D. (2002). The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 100, 2292–2302. 10.1182/blood-2002-04-1199.
91. Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N.L., Le Beau, M.M., Hellström-Lindberg, E., Tefferi, A., et al. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114, 937–951. 10.1182/blood-2009-03-209262.

92. Arber, D.A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M.J., Le Beau, M.M., Bloomfield, C.D., Cazzola, M., and Vardiman, J.W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127, 2391–2405. [10.1182/blood-2016-03-643544](https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544).
93. Khoury, J.D., Solary, E., Abla, O., Akkari, Y., Alaggio, R., Apperley, J.F., Bejar, R., Berti, E., Busque, L., Chan, J.K.C., et al. (2022). The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* 36, 1703–1719. [10.1038/s41375-022-01613-1](https://doi.org/10.1038/s41375-022-01613-1).
94. Engel, N.W., Reinert, J., Borchert, N.M., Panagiota, V., Gabdoulline, R., Thol, F., Heuser, M., and Fiedler, W. (2021). Newly diagnosed isolated myeloid sarcoma—paired NGS panel analysis of extramedullary tumor and bone marrow. *Ann. Hematol.* 100, 499–503. [10.1007/s00277-020-04313-x](https://doi.org/10.1007/s00277-020-04313-x).
95. Trumpp, A., and Haas, S. (2022). Cancer stem cells: The adventurous journey from hematopoietic to leukemic stem cells. *Cell* 185, 1266–1270. [10.1016/j.cell.2022.03.025](https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.03.025).
96. 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](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1301689).
97. Jaiswal, S., and Ebert, B.L. (2019). Clonal hematopoiesis in human aging and disease. *Science* 366, eaan4673. [10.1126/science.aan4673](https://doi.org/10.1126/science.aan4673).
98. Bullinger, L., Döhner, K., and Döhner, H. (2017). Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways. *J. Clin. Oncol.* 35, 934–946. [10.1200/JCO.2016.71.2208](https://doi.org/10.1200/JCO.2016.71.2208).
99. Grove, C.S., and Vassiliou, G.S. (2014). Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer? *Dis. Model. Mech.* 7, 941–951. [10.1242/dmm.015974](https://doi.org/10.1242/dmm.015974).
100. Lawrence, M.S., Stojanov, P., Polak, P., Kryukov, G.V., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Carter, S.L., Stewart, C., Mermel, C.H., Roberts, S.A., et al. (2013). Mutational heterogeneity in

- cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 499, 214–218. 10.1038/nature12213.
101. Meyer, S.C., and Levine, R.L. (2014). Translational implications of somatic genomics in acute myeloid leukaemia. *Lancet Oncol.* 15, e382–e394. 10.1016/S1470-2045(14)70008-7.
102. Stratton, M.R., Campbell, P.J., and Futreal, P.A. (2009). The cancer genome. *Nature* 458, 719–724. 10.1038/nature07943.
103. Döhner, K., Schlenk, R.F., Habdank, M., Scholl, C., Rücker, F.G., Corbacioglu, A., Bullinger, L., Fröhling, S., and Döhner, H. (2005). Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* 106, 3740–3746. 10.1182/blood-2005-05-2164.
104. Thiede, C., Koch, S., Creutzig, E., Steudel, C., Illmer, T., Schaich, M., and Ehninger, G. (2006). Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 107, 4011–4020. 10.1182/blood-2005-08-3167.
105. Heath, E.M., Chan, S.M., Minden, M.D., Murphy, T., Shlush, L.I., and Schimmer, A.D. (2017). Biological and clinical consequences of NPM1 mutations in AML. *Leukemia* 31, 798–807. 10.1038/leu.2017.30.
106. Short, N.J., Nguyen, D., and Ravandi, F. (2023). Treatment of older adults with FLT3-mutated AML: Emerging paradigms and the role of frontline FLT3 inhibitors. *Blood Cancer J.* 13, 142. 10.1038/s41408-023-00911-w.
107. Hayakawa, F., Towatari, M., Kiyoi, H., Tanimoto, M., Kitamura, T., Saito, H., and Naoe, T. (2000). Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene* 19, 624–631. 10.1038/sj.onc.1203354.

108. Perkins, G.R., Marshall, C.J., and Collins, M.K.L. (1996). The Role of MAP Kinase Kinase in Interleukin-3 Stimulation of Proliferation. *Blood* 87, 3669–3675. 10.1182/blood.V87.9.3669.bloodjournal8793669.
109. Schubbert, S., Shannon, K., and Bollag, G. (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 295–308. 10.1038/nrc2109.
110. Heyes, E., Wilhelmson, A.S., Wenzel, A., Manhart, G., Eder, T., Schuster, M.B., Rzepa, E., Pundhir, S., D’Altri, T., Frank, A.-K., et al. (2023). TET2 lesions enhance the aggressiveness of CEBPA-mutant acute myeloid leukemia by rebalancing GATA2 expression. *Nat. Commun.* 14, 6185. 10.1038/s41467-023-41927-x.
111. Ohlsson, E., Schuster, M.B., Hasemann, M., and Porse, B.T. (2016). The multifaceted functions of C/EBP α in normal and malignant haematopoiesis. *Leukemia* 30, 767–775. 10.1038/leu.2015.324.
112. Pabst, T., Mueller, B.U., Zhang, P., Radomska, H.S., Narravula, S., Schnittger, S., Behre, G., Hiddemann, W., and Tenen, D.G. (2001). Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein- α (C/EBP α), in acute myeloid leukemia. *Nat. Genet.* 27, 263–270. 10.1038/85820.
113. Porse, B.T., Pedersen, T.Å., Xu, X., Lindberg, B., Wewer, U.M., Friis-Hansen, L., and Nerlov, C. (2001). E2F Repression by C/EBP α Is Required for Adipogenesis and Granulopoiesis In Vivo. *Cell* 107, 247–258. 10.1016/S0092-8674(01)00516-5.
114. Braekeleer, E.D., Férec, C., and Braekeleer, M.D. (2009). RUNX1 Translocations in Malignant Hemopathies. *Anticancer Res.* 29, 1031–1037.
115. de Thé, H., Lavau, C., Marchio, A., Chomienne, C., Degos, L., and Dejean, A. (1991). The PML-RAR α fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* 66, 675–684. 10.1016/0092-8674(91)90113-D.
116. Liu, P., Tarlé, S.A., Hajra, A., Claxton, D.F., Marlton, P., Freedman, M., Siciliano, M.J., and Collins, F.S. (1993). Fusion between transcription factor CBF beta/PEBP2 beta and a

- myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. *Science* 261, 1041–1044. 10.1126/science.8351518.
117. Bowen, D., Groves, M.J., Burnett, A.K., Patel, Y., Allen, C., Green, C., Gale, R.E., Hills, R., and Linch, D.C. (2009). TP53 gene mutation is frequent in patients with acute myeloid leukemia and complex karyotype, and is associated with very poor prognosis. *Leukemia* 23, 203–206. 10.1038/leu.2008.173.
118. Ley, T.J., Ding, L., Walter, M.J., McLellan, M.D., Lamprecht, T., Larson, D.E., Kandoth, C., Payton, J.E., Baty, J., Welch, J., et al. (2010). DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 363, 2424–2433. 10.1056/NEJMoa1005143.
119. 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. 10.1038/nature13038.
120. Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Bullinger, L., Gaidzik, V.I., Paschka, P., Roberts, N.D., Potter, N.E., Heuser, M., Thol, F., Bolli, N., et al. (2016). Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 374, 2209–2221. 10.1056/NEJMoa1516192.
121. 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. 10.1084/jem.20092506.
122. Figueroa, M.E., Wahab, O.A., 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. 10.1016/j.ccr.2010.11.015.
123. Moran-Crusio, K., Reavie, L., Shih, A., Abdel-Wahab, O., Ndiaye-Lobry, D., Lobry, C., Figueroa, M.E., Vasanthakumar, A., Patel, J., Zhao, X., et al. (2011). Tet2 Loss Leads to

- Increased Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Myeloid Transformation. *Cancer Cell* 20, 11–24. 10.1016/j.ccr.2011.06.001.
124. Corral, J., Lavenir, I., Impey, H., Warren, A.J., Forster, A., Larson, T.A., Bell, S., McKenzie, A.N.J., King, G., and Rabbitts, T.H. (1996). An Mll–AF9 Fusion Gene Made by Homologous Recombination Causes Acute Leukemia in Chimeric Mice: A Method to Create Fusion Oncogenes. *Cell* 85, 853–861. 10.1016/S0092-8674(00)81269-6.
125. Récher, C. (2021). Clinical Implications of Inflammation in Acute Myeloid Leukemia. *Front. Oncol.* 11, 623952. 10.3389/fonc.2021.623952.
126. Lim, W.-S., Tardi, P.G., Dos Santos, N., Xie, X., Fan, M., Liboiron, B.D., Huang, X., Harasym, T.O., Bermudes, D., and Mayer, L.D. (2010). Leukemia-selective uptake and cytotoxicity of CPX-351, a synergistic fixed-ratio cytarabine:daunorubicin formulation, in bone marrow xenografts. *Leuk. Res.* 34, 1214–1223. 10.1016/j.leukres.2010.01.015.
127. Uy, G.L., Newell, L.F., Lin, T., Goldberg, S.L., Wieduwilt, M.J., Ryan, R.J., Faderl, S., and Lancet, J.E. (2020). Long-Term Outcomes of Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in Patients Enrolled in CPX-351-301, a Randomized Phase 3 Study of CPX-351 Versus 7+3 in Older Adults with Newly Diagnosed, High-Risk and/or Secondary AML. *Blood* 136, 44–45. 10.1182/blood-2020-136882.
128. Cornelissen, J.J., and Blaise, D. (2016). Hematopoietic stem cell transplantation for patients with AML in first complete remission. *Blood* 127, 62–70. 10.1182/blood-2015-07-604546.
129. Heinicke, T., Krahl, R., Kahl, C., Cross, M., Scholl, S., Wolf, H.-H., Hähling, D., Hegenbart, U., Peter, N., Schulze, A., et al. (2021). Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation improves long-term outcome for relapsed AML patients across all ages: results from two East German Study Group Hematology and Oncology (OSHO) trials. *Ann. Hematol.* 100, 2387–2398. 10.1007/s00277-021-04565-1.
130. Huls, G., Chitu, D.A., Havelange, V., Jongen-Lavrencic, M., van de Loosdrecht, A.A., Biemond, B.J., Sinnige, H., Hodossy, B., Graux, C., Kooy, R. van M., et al. (2019).

- Azacitidine maintenance after intensive chemotherapy improves DFS in older AML patients. *Blood* 133, 1457–1464. 10.1182/blood-2018-10-879866.
131. Stone, R.M., Mandrekar, S.J., Sanford, B.L., Laumann, K., Geyer, S., Bloomfield, C.D., Thiede, C., Prior, T.W., Döhner, K., Marcucci, G., et al. (2017). Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N. Engl. J. Med.* 377, 454–464. 10.1056/NEJMoa1614359.
132. Sekeres, M.A., Elson, P., Kalaycio, M.E., Advani, A.S., Copelan, E.A., Faderl, S., Kantarjian, H.M., and Estey, E. (2009). Time from diagnosis to treatment initiation predicts survival in younger, but not older, acute myeloid leukemia patients. *Blood* 113, 28–36. 10.1182/blood-2008-05-157065.
133. Krug, U., Röllig, C., Koschmieder, A., Heinecke, A., Sauerland, M.C., Schaich, M., Thiede, C., Kramer, M., Braess, J., Spiekermann, K., et al. (2010). Complete remission and early death after intensive chemotherapy in patients aged 60 years or older with acute myeloid leukaemia: a web-based application for prediction of outcomes. *The Lancet* 376, 2000–2008. 10.1016/S0140-6736(10)62105-8.
134. 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.
135. Wei, A.H., Montesinos, P., Ivanov, V., DiNardo, C.D., Novak, J., Laribi, K., Kim, I., Stevens, D.A., Fiedler, W., Pagoni, M., et al. (2020). Venetoclax plus LDAC for newly diagnosed AML ineligible for intensive chemotherapy: a phase 3 randomized placebo-controlled trial. *Blood* 135, 2137–2145. 10.1182/blood.2020004856.
136. Récher, C. (2021). The beginning of a new therapeutic era in acute myeloid leukemia. *EJHaem* 2, 823–833. 10.1002/jha2.252.
137. Larson, R.A., Mandrekar, S.J., Huebner, L.J., Sanford, B.L., Laumann, K., Geyer, S., Bloomfield, C.D., Thiede, C., Prior, T.W., Döhner, K., et al. (2021). Midostaurin reduces

- relapse in FLT3-mutant acute myeloid leukemia: the Alliance CALGB 10603/RATIFY trial. *Leukemia* 35, 2539–2551. 10.1038/s41375-021-01179-4.
138. Cortes, J.E., Khaled, S., Martinelli, G., Perl, A.E., Ganguly, S., Russell, N., Krämer, A., Dombret, H., Hogge, D., Jonas, B.A., et al. (2019). Quizartinib versus salvage chemotherapy in relapsed or refractory FLT3-ITD acute myeloid leukaemia (QuANTUM-R): a multicentre, randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 20, 984–997. 10.1016/S1470-2045(19)30150-0.
139. Ambinder, A.J., and Levis, M. (2020). Potential targeting of FLT3 acute myeloid leukemia. *Haematologica* 106, 671–681. 10.3324/haematol.2019.240754.
140. Burchert, A., Bug, G., Fritz, L.V., Finke, J., Stelljes, M., Röllig, C., Wollmer, E., Wäsch, R., Bornhäuser, M., Berg, T., et al. (2020). Sorafenib Maintenance After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia With FLT3–Internal Tandem Duplication Mutation (SORMAIN). *J. Clin. Oncol.* 38, 2993–3002. 10.1200/JCO.19.03345.
141. Roboz, G.J., DiNardo, C.D., Stein, E.M., de Botton, S., Mims, A.S., Prince, G.T., Altman, J.K., Arellano, M.L., Donnellan, W., Erba, H.P., et al. (2020). Ivosidenib induces deep durable remissions in patients with newly diagnosed IDH1-mutant acute myeloid leukemia. *Blood* 135, 463–471. 10.1182/blood.2019002140.
142. Montesinos, P., Recher, C., Vives, S., Zarzycka, E., Wang, J., Bertani, G., Heuser, M., Calado, R.T., Schuh, A.C., Yeh, S.-P., et al. (2022). Ivosidenib and Azacitidine in IDH1-Mutated Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 386, 1519–1531. 10.1056/NEJMoa2117344.
143. Research, C. for D.E. and (2022). FDA approves olutasidenib for relapsed or refractory acute myeloid leukemia with a susceptible IDH1 mutation. FDA.
144. Stein, E.M. (2018). Enasidenib, a targeted inhibitor of mutant IDH2 proteins for treatment of relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Future Oncol.* 14, 23–40. 10.2217/fon-2017-0392.

145. Campos, L., Rouault, J.-P., Sabido, O., Oriol, P., Roubi, N., Vasselon, C., Archimbaud, E., Magaud, J.-P., and Guyotat, D. (1993). High Expression of bcl-2 Protein in Acute Myeloid Leukemia Cells Is Associated With Poor Response to Chemotherapy. *Blood* *81*, 3091–3096. 10.1182/blood.V81.11.3091.3091.
146. Perl, A.E., Daver, N.G., Pratz, K.W., Maly, J., Hong, W.-J., Bahceci, E., Tong, B., Tian, T., and Dilley, K. (2019). Venetoclax in Combination with Gilteritinib in Patients with Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia: A Phase 1b Study. *Blood* *134*, 3910. 10.1182/blood-2019-127416.
147. Daver, N.G., Garcia, J.S., Jonas, B.A., Kelly, K.R., Assouline, S., Brandwein, J.M., Fenaux, P., Olin, R.L., Martinelli, G., Paolini, S., et al. (2019). Updated Results from the Venetoclax (Ven) in Combination with Idasanutlin (Idasa) Arm of a Phase 1b Trial in Elderly Patients (Pts) with Relapsed or Refractory (R/R) AML Ineligible for Cytotoxic Chemotherapy. *Blood* *134*, 229. 10.1182/blood-2019-123711.
148. Miyamoto, K., and Minami, Y. (2020). Cutting Edge Molecular Therapy for Acute Myeloid Leukemia. *Int. J. Mol. Sci.* *21*, 5114. 10.3390/ijms21145114.
149. Hansen, Q., Bachas, C., Smit, L., and Cloos, J. (2022). Characteristics of leukemic stem cells in acute leukemia and potential targeted therapies for their specific eradication. *Cancer Drug Resist.* *5*, 344–367. 10.20517/cdr.2021.140.
150. Huang, C.-Y., Ye, Z.-H., Huang, M.-Y., and Lu, J.-J. (2020). Regulation of CD47 expression in cancer cells. *Transl. Oncol.* *13*, 100862. 10.1016/j.tranon.2020.100862.
151. Pietsch, E.C., Dong, J., Cardoso, R., Zhang, X., Chin, D., Hawkins, R., Dinh, T., Zhou, M., Strake, B., Feng, P.-H., et al. (2017). Anti-leukemic activity and tolerability of anti-human CD47 monoclonal antibodies. *Blood Cancer J.* *7*, e536. 10.1038/bcj.2017.7.
152. Lambert, J., Pautas, C., Terré, C., Raffoux, E., Turlure, P., Caillot, D., Legrand, O., Thomas, X., Gardin, C., Gogat-Marchant, K., et al. (2019). Gemtuzumab ozogamicin for de novo acute myeloid leukemia: final efficacy and safety updates from the open-label, phase III ALFA-0701 trial. *Haematologica* *104*, 113–119. 10.3324/haematol.2018.188888.

153. Stein, E.M., Walter, R.B., Erba, H.P., Fathi, A.T., Advani, A.S., Lancet, J.E., Ravandi, F., Kovacsocics, T., DeAngelo, D.J., Bixby, D., et al. (2018). A phase 1 trial of vadastuximab talirine as monotherapy in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia. *Blood* 131, 387–396. 10.1182/blood-2017-06-789800.
154. Guy, D.G., and Uy, G.L. (2018). Bispecific Antibodies for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 13, 417–425. 10.1007/s11899-018-0472-8.
155. Ritchie, D.S., Neeson, P.J., Khot, A., Peinert, S., Tai, T., Tainton, K., Chen, K., Shin, M., Wall, D.M., Hönemann, D., et al. (2013). Persistence and efficacy of second generation CAR T cell against the LeY antigen in acute myeloid leukemia. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 21, 2122–2129. 10.1038/mt.2013.154.
156. Kenderian, S.S., Ruella, M., Shestova, O., Klichinsky, M., Aikawa, V., Morrissette, J.J.D., Scholler, J., Song, D., Porter, D.L., Carroll, M., et al. (2015). CD33-specific chimeric antigen receptor T cells exhibit potent preclinical activity against human acute myeloid leukemia. *Leukemia* 29, 1637–1647. 10.1038/leu.2015.52.
157. Gomes-Silva, D., Atilla, E., Atilla, P.A., Mo, F., Tashiro, H., Srinivasan, M., Lulla, P., Rouce, R.H., Cabral, J.M.S., Ramos, C.A., et al. (2019). CD7 CAR T Cells for the Therapy of Acute Myeloid Leukemia. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 27, 272–280. 10.1016/j.ymthe.2018.10.001.
158. Wang, J., Chen, S., Xiao, W., Li, W., Wang, L., Yang, S., Wang, W., Xu, L., Liao, S., Liu, W., et al. (2018). CAR-T cells targeting CLL-1 as an approach to treat acute myeloid leukemia. *J. Hematol. Oncol.* 11, 7. 10.1186/s13045-017-0553-5.
159. Mardiros, A., Dos Santos, C., McDonald, T., Brown, C.E., Wang, X., Budde, L.E., Hoffman, L., Aguilar, B., Chang, W.-C., Bretzlaff, W., et al. (2013). T cells expressing CD123-specific chimeric antigen receptors exhibit specific cytolytic effector functions and antitumor effects against human acute myeloid leukemia. *Blood* 122, 3138–3148. 10.1182/blood-2012-12-474056.
160. Keilholz, U., Letsch, A., Busse, A., Asemissen, A.M., Bauer, S., Blau, I.W., Hofmann, W.-K., Uharek, L., Thiel, E., and Scheibenbogen, C. (2009). A clinical and immunologic phase 2

- trial of Wilms tumor gene product 1 (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS. *Blood* 113, 6541–6548. 10.1182/blood-2009-02-202598.
161. Keilholz, U., Menssen, H.D., Gaiger, A., Menke, A., Oji, Y., Oka, Y., Scheibenbogen, C., Stauss, H., Thiel, E., and Sugiyama, H. (2005). Wilms' tumour gene 1 (WT1) in human neoplasia. *Leukemia* 19, 1318–1323. 10.1038/sj.leu.2403817.
162. di Martino, O., and Welch, J.S. (2019). Retinoic Acid Receptors in Acute Myeloid Leukemia Therapy. *Cancers* 11, 1915. 10.3390/cancers11121915.
163. Cordeiro, T.N., Sibille, N., Germain, P., Barthe, P., Boulahtouf, A., Allemand, F., Bailly, R., Vivat, V., Ebel, C., Barducci, A., et al. (2019). Interplay of Protein Disorder in Retinoic Acid Receptor Heterodimer and Its Corepressor Regulates Gene Expression. *Struct. Lond. Engl.* 1993 27, 1270-1285.e6. 10.1016/j.str.2019.05.001.
164. Noguera, N.I., Piredda, M.L., Taulli, R., Catalano, G., Angelini, G., Gaur, G., Nervi, C., Voso, M.T., Lunardi, A., Pandolfi, P.P., et al. (2016). PML/RAR α inhibits PTEN expression in hematopoietic cells by competing with PU.1 transcriptional activity. *Oncotarget* 7, 66386–66397. 10.18632/oncotarget.11964.
165. Zhou, G.-B., Zhang, J., Wang, Z.-Y., Chen, S.-J., and Chen, Z. (2007). Treatment of acute promyelocytic leukaemia with all-trans retinoic acid and arsenic trioxide: a paradigm of synergistic molecular targeting therapy. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 362, 959–971. 10.1098/rstb.2007.2026.
166. Lu, D.-P., Qiu, J.-Y., Jiang, B., Wang, Q., Liu, K.-Y., Liu, Y.-R., and Chen, S.-S. (2002). Tetra-arsenic tetra-sulfide for the treatment of acute promyelocytic leukemia: a pilot report. *Blood* 99, 3136–3143. 10.1182/blood.v99.9.3136.
167. Brown, G., and Hughes, P. (2012). Retinoid Differentiation Therapy for Common Types of Acute Myeloid Leukemia. *Leuk. Res. Treat.* 2012, 939021. 10.1155/2012/939021.
168. Deeb, K.K., Trump, D.L., and Johnson, C.S. (2007). Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* 7, 684–700. 10.1038/nrc2196.

169. Lösel, R., and Wehling, M. (2003). Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 46–55. 10.1038/nrm1009.
170. Munker, R., Norman, A., and Koeffler, H.P. (1986). Vitamin D compounds. Effect on clonal proliferation and differentiation of human myeloid cells. *J. Clin. Invest.* *78*, 424–430.
171. Rigby, W.F., Shen, L., Ball, E.D., Guyre, P.M., and Fanger, M.W. (1984). Differentiation of a human monocytic cell line by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (calcitriol): a morphologic, phenotypic, and functional analysis. *Blood* *64*, 1110–1115.
172. Mouchel, P.L., Bérard, E., Tavitian, S., Gadaud, N., Vergez, F., Rieu, J.B., Luquet, I., Sarry, A., Huguet, F., Largeaud, L., et al. (2023). Vitamin C and D Supplementation in Acute Myeloid Leukemia. *Blood Adv.*, bloodadvances.2023010559. 10.1182/bloodadvances.2023010559.
173. Paubelle, E., Zylbersztejn, F., Maciel, T.T., Carvalho, C., Mupo, A., Cheok, M., Lieben, L., Sujobert, P., Decroocq, J., Yokoyama, A., et al. (2020). Vitamin D Receptor Controls Cell Stemness in Acute Myeloid Leukemia and in Normal Bone Marrow. *Cell Rep.* *30*, 739-754.e4. 10.1016/j.celrep.2019.12.055.
174. Bhattacharjee, R., Ghosh, S., Nath, A., Basu, A., Biswas, O., Patil, C.R., and Kundu, C.N. (2022). Theragnostic strategies harnessing the self-renewal pathways of stem-like cells in the acute myeloid leukemia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *177*, 103753. 10.1016/j.critrevonc.2022.103753.
175. Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* *3*, 730–737. 10.1038/nm0797-730.
176. Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* *414*, 105–111. 10.1038/35102167.
177. Jan, M., Snyder, T.M., Corces-Zimmerman, M.R., Weissman, I.L., Quake, S.R., and Majeti, R. (2011). Clonal Evolution of Pre-Leukemic Hematopoietic Stem Cells Precedes Human Acute Myeloid Leukemia. *Blood* *118*, 4. 10.1182/blood.V118.21.4.4.

178. Trumpp, A., and Haas, S. (2022). Cancer stem cells: The adventurous journey from hematopoietic to leukemic stem cells. *Cell* *185*, 1266–1270. 10.1016/j.cell.2022.03.025.
179. Jan, M., Snyder, T.M., Corces-Zimmerman, M.R., Vyas, P., Weissman, I.L., Quake, S.R., and Majeti, R. (2012). Clonal Evolution of Pre-Leukemic Hematopoietic Stem Cells Precedes Human Acute Myeloid Leukemia. *Sci. Transl. Med.* *4*, 149ra118. 10.1126/scitranslmed.3004315.
180. Steensma, D.P., Bejar, R., Jaiswal, S., Lindsley, R.C., Sekeres, M.A., Hasserjian, R.P., and Ebert, B.L. (2015). Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood* *126*, 9–16. 10.1182/blood-2015-03-631747.
181. Sood, R., Hansen, N.F., Donovan, F.X., Carrington, B., Bucci, D., Maskeri, B., Young, A., Trivedi, N.S., Kohlschmidt, J., Stone, R.M., et al. (2016). Somatic mutational landscape of AML with inv(16) or t(8;21) identifies patterns of clonal evolution in relapse leukemia. *Leukemia* *30*, 501–504. 10.1038/leu.2015.141.
182. Kasbekar, M., Mitchell, C.A., Proven, M.A., and Passegué, E. (2023). Hematopoietic stem cells through the ages: A lifetime of adaptation to organismal demands. *Cell Stem Cell* *30*, 1403–1420. 10.1016/j.stem.2023.09.013.
183. Ishikawa, F., Yoshida, S., Saito, Y., Hijikata, A., Kitamura, H., Tanaka, S., Nakamura, R., Tanaka, T., Tomiyama, H., Saito, N., et al. (2007). Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nat. Biotechnol.* *25*, 1315–1321. 10.1038/nbt1350.
184. Stelmach, P., and Trumpp, A. (2023). Leukemic stem cells and therapy resistance in acute myeloid leukemia. *Haematologica* *108*, 353–366. 10.3324/haematol.2022.280800.
185. Shatkin, A.J. (1985). mRNA cap binding proteins: essential factors for initiating translation. *Cell* *40*, 223–224. 10.1016/0092-8674(85)90132-1.
186. Pelletier, J., Schmeing, T.M., and Sonenberg, N. (2021). The multifaceted eukaryotic cap structure. *WIREs RNA* *12*, e1636. 10.1002/wrna.1636.

187. Walters, B., and Thompson, S.R. (2016). Cap-Independent Translational Control of Carcinogenesis. *Front. Oncol.* *6*, 128. 10.3389/fonc.2016.00128.
188. Lasfargues, C., Martineau, Y., Bousquet, C., and Pyronnet, S. (2012). Changes in Translational Control after Pro-Apoptotic Stress. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 177–190. 10.3390/ijms14010177.
189. Etchison, D., Milburn, S.C., Edery, I., Sonenberg, N., and Hershey, J.W. (1982). Inhibition of HeLa cell protein synthesis following poliovirus infection correlates with the proteolysis of a 220,000-dalton polypeptide associated with eucaryotic initiation factor 3 and a cap binding protein complex. *J. Biol. Chem.* *257*, 14806–14810.
190. Pyronnet, S., Dostie, J., and Sonenberg, N. (2001). Suppression of cap-dependent translation in mitosis. *Genes Dev.* *15*, 2083–2093. 10.1101/gad.889201.
191. Lane, N., and Martin, W. (2010). The energetics of genome complexity. *Nature* *467*, 929–934. 10.1038/nature09486.
192. Hershey, J.W.B., Sonenberg, N., and Mathews, M.B. (2019). Principles of Translational Control. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *11*, a032607. 10.1101/cshperspect.a032607.
193. Groppo, R., and Richter, J.D. (2009). Translational control from head to tail. *Curr. Opin. Cell Biol.* *21*, 444–451. 10.1016/j.ceb.2009.01.011.
194. Sonenberg, N., and Hinnebusch, A.G. (2009). Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell* *136*, 731–745. 10.1016/j.cell.2009.01.042.
195. Spahn, C.M., Gomez-Lorenzo, M.G., Grassucci, R.A., Jørgensen, R., Andersen, G.R., Beckmann, R., Penczek, P.A., Ballesta, J.P., and Frank, J. (2004). Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation. *EMBO J.* *23*, 1008–1019. 10.1038/sj.emboj.7600102.
196. Fan-Minogue, H., Du, M., Pisarev, A.V., Kallmeyer, A.K., Salas-Marco, J., Keeling, K.M., Thompson, S.R., Pestova, T.V., and Bedwell, D.M. (2008). Distinct eRF3 Requirements

- Suggest Alternate eRF1 Conformations Mediate Peptide Release during Eukaryotic Translation Termination. *Mol. Cell* 30, 599–609. 10.1016/j.molcel.2008.03.020.
197. Kisselev, L., Ehrenberg, M., and Frolova, L. (2003). Termination of translation: interplay of mRNA, rRNAs and release factors? *EMBO J.* 22, 175–182. 10.1093/emboj/cdg017.
198. Majumdar, R., Bandyopadhyay, A., and Maitra, U. (2003). Mammalian translation initiation factor eIF1 functions with eIF1A and eIF3 in the formation of a stable 40 S preinitiation complex. *J. Biol. Chem.* 278, 6580–6587. 10.1074/jbc.M210357200.
199. Merrick, W.C., and Pavitt, G.D. (2018). Protein Synthesis Initiation in Eukaryotic Cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 10, a033092. 10.1101/cshperspect.a033092.
200. Sokabe, M., and Fraser, C.S. (2014). Human Eukaryotic Initiation Factor 2 (eIF2)-GTP-Met-tRNAⁱ Ternary Complex and eIF3 Stabilize the 43 S Preinitiation Complex. *J. Biol. Chem.* 289, 31827–31836. 10.1074/jbc.M114.602870.
201. Asano, K., Clayton, J., Shalev, A., and Hinnebusch, A.G. (2000). A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA^{Met} is an important translation initiation intermediate in vivo. *Genes Dev.* 14, 2534–2546.
202. Kozak, M. (1981). Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res.* 9, 5233–5252. 10.1093/nar/9.20.5233.
203. Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2010). THE MECHANISM OF EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION AND PRINCIPLES OF ITS REGULATION. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 113–127. 10.1038/nrm2838.
204. Kapp, L.D., and Lorsch, J.R. (2004). GTP-dependent recognition of the methionine moiety on initiator tRNA by translation factor eIF2. *J. Mol. Biol.* 335, 923–936. 10.1016/j.jmb.2003.11.025.
205. Wek, R.C. (2018). Role of eIF2 α Kinases in Translational Control and Adaptation to Cellular Stress. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 10, a032870. 10.1101/cshperspect.a032870.

206. Shin, S., Solorzano, J., Liauzun, M., Pyronnet, S., Bousquet, C., and Martineau, Y. (2022). Translational alterations in pancreatic cancer: a central role for the integrated stress response. *NAR Cancer* 4, zcac031. 10.1093/narcan/zcac031.
207. Pelletier, J., and Sonenberg, N. (2019). The Organizing Principles of Eukaryotic Ribosome Recruitment. *Annu. Rev. Biochem.* 88, 307–335. 10.1146/annurev-biochem-013118-111042.
208. Marcotrigiano, J., Gingras, A.-C., Sonenberg, N., and Burley, S.K. (1997). Cocrystal Structure of the Messenger RNA 5' Cap-Binding Protein (eIF4E) Bound to 7-methyl-GDP. *Cell* 89, 951–961. 10.1016/S0092-8674(00)80280-9.
209. Korneeva, N.L., Lamphear, B.J., Hennigan, F.L., and Rhoads, R.E. (2000). Mutually cooperative binding of eukaryotic translation initiation factor (eIF) 3 and eIF4A to human eIF4G-1. *J. Biol. Chem.* 275, 41369–41376. 10.1074/jbc.M007525200.
210. Pyronnet, S., Imataka, H., Gingras, A.C., Fukunaga, R., Hunter, T., and Sonenberg, N. (1999). Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *EMBO J.* 18, 270–279. 10.1093/emboj/18.1.270.
211. Yanagiya, A., Svitkin, Y.V., Shibata, S., Mikami, S., Imataka, H., and Sonenberg, N. (2009). Requirement of RNA binding of mammalian eukaryotic translation initiation factor 4GI (eIF4GI) for efficient interaction of eIF4E with the mRNA cap. *Mol. Cell. Biol.* 29, 1661–1669. 10.1128/MCB.01187-08.
212. Imataka, H., Gradi, A., and Sonenberg, N. (1998). A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J.* 17, 7480–7489. 10.1093/emboj/17.24.7480.
213. Kahvejian, A., Roy, G., and Sonenberg, N. (2001). The mRNA closed-loop model: the function of PABP and PABP-interacting proteins in mRNA translation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 66, 293–300. 10.1101/sqb.2001.66.293.

214. Kahvejian, A., Svitkin, Y.V., Sukarieh, R., M'Boutchou, M.-N., and Sonenberg, N. (2005). Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev.* *19*, 104–113. 10.1101/gad.1262905.
215. Gallie, D.R. (1991). The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev.* *5*, 2108–2116. 10.1101/gad.5.11.2108.
216. Grifo, J.A., Abramson, R.D., Satler, C.A., and Merrick, W.C. (1984). RNA-stimulated ATPase activity of eukaryotic initiation factors. *J. Biol. Chem.* *259*, 8648–8654. 10.1016/S0021-9258(17)39779-X.
217. Andreou, A.Z., and Klostermeier, D. (2013). The DEAD-box helicase eIF4A. *RNA Biol.* *10*, 19–32. 10.4161/rna.21966.
218. Kumar, P., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2016). Toward the mechanism of eIF4F-mediated ribosomal attachment to mammalian capped mRNAs. *Genes Dev.* *30*, 1573–1588. 10.1101/gad.282418.116.
219. Garcia-Garcia, C., Frieda, K.L., Feoktistova, K., Fraser, C.S., and Block, S.M. (2015). Factor-dependent processivity in human eIF4A DEAD-box helicase. *SCIENCE* *348*, 1486–1488. 10.1126/science.aaa5089.
220. Andreou, A.Z., Harms, U., and Klostermeier, D. (2016). eIF4B stimulates eIF4A ATPase and unwinding activities by direct interaction through its 7-repeats region. *RNA Biol.* *14*, 113–123. 10.1080/15476286.2016.1259782.
221. Joshi, B., Cameron, A., and Jagus, R. (2004). Characterization of mammalian eIF4E-family members. *Eur. J. Biochem.* *271*, 2189–2203. 10.1111/j.1432-1033.2004.04149.x.
222. Joshi, B., Lee, K., Maeder, D.L., and Jagus, R. (2005). Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. *BMC Evol. Biol.* *5*, 48. 10.1186/1471-2148-5-48.
223. Hiremath, L.S., Webb, N.R., and Rhoads, R.E. (1985). Immunological detection of the messenger RNA cap-binding protein. *J. Biol. Chem.* *260*, 7843–7849.

224. Jones, R.M., Branda, J., Johnston, K.A., Polymenis, M., Gadd, M., Rustgi, A., Callanan, L., and Schmidt, E.V. (1996). An essential E box in the promoter of the gene encoding the mRNA cap-binding protein (eukaryotic initiation factor 4E) is a target for activation by c-myc. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 4754–4764. 10.1128/MCB.16.9.4754.
225. Osborne, M.J., Volpon, L., Memarpoor-Yazdi, M., Pillay, S., Thambipillai, A., Czarnota, S., Culjkovic-Kraljacic, B., Trahan, C., Oeffinger, M., Cowling, V.H., et al. (2022). Identification and characterization of the interaction between the methyl-7-guanosine cap maturation enzyme RNMT and the cap-binding protein eIF4E. *J. Mol. Biol.* *434*, 167451. 10.1016/j.jmb.2022.167451.
226. Joshi, B., Cai, A.L., Keiper, B.D., Minich, W.B., Mendez, R., Beach, C.M., Stepinski, J., Stolarski, R., Darzynkiewicz, E., and Rhoads, R.E. (1995). Phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E at Ser-209. *J. Biol. Chem.* *270*, 14597–14603. 10.1074/jbc.270.24.14597.
227. Sonenberg, N., and Gingras, A.-C. (1998). The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr. Opin. Cell Biol.* *10*, 268–275. 10.1016/S0955-0674(98)80150-6.
228. Waskiewicz, A.J., Johnson, J.C., Penn, B., Mahalingam, M., Kimball, S.R., and Cooper, J.A. (1999). Phosphorylation of the Cap-Binding Protein Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E by Protein Kinase Mnk1 In Vivo. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 1871–1880.
229. Mader, S., Lee, H., Pause, A., and Sonenberg, N. (1995). The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 4990–4997. 10.1128/MCB.15.9.4990.
230. Scheper, G.C., and Proud, C.G. (2002). Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation? *Eur. J. Biochem.* *269*, 5350–5359. 10.1046/j.1432-1033.2002.03291.x.

231. McKendrick, L., Morley, S.J., Pain, V.M., Jagus, R., and Joshi, B. (2001). Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) at Ser209 is not required for protein synthesis in vitro and in vivo. *Eur. J. Biochem.* 268, 5375–5385. 10.1046/j.0014-2956.2001.02478.x.
232. Lin, T.A., Kong, X., Haystead, T.A., Pause, A., Belsham, G., Sonenberg, N., and Lawrence, J.C. (1994). PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation. *Science* 266, 653–656. 10.1126/science.7939721.
233. Pause, A., Belsham, G.J., Gingras, A.C., Donzé, O., Lin, T.A., Lawrence, J.C., and Sonenberg, N. (1994). Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* 371, 762–767. 10.1038/371762a0.
234. Poulin, F., Gingras, A.-C., Olsen, H., Chevalier, S., and Sonenberg, N. (1998). 4E-BP3, a New Member of the Eukaryotic Initiation Factor 4E-binding Protein Family*. *J. Biol. Chem.* 273, 14002–14007. 10.1074/jbc.273.22.14002.
235. Martineau, Y., Azar, R., Bousquet, C., and Pyronnet, S. (2013). Anti-oncogenic potential of the eIF4E-binding proteins. *Oncogene* 32, 671–677. 10.1038/onc.2012.116.
236. Topisirovic, I., and Sonenberg, N. (2011). mRNA Translation and Energy Metabolism in Cancer: The Role of the MAPK and mTORC1 Pathways. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 76, 355–367. 10.1101/sqb.2011.76.010785.
237. Yang, X., Zhong, W., and Cao, R. (2020). Phosphorylation of the mRNA cap-binding protein eIF4E and cancer. *Cell. Signal.* 73, 109689. 10.1016/j.cellsig.2020.109689.
238. Gingras, A.-C., Kennedy, S.G., O'Leary, M.A., Sonenberg, N., and Hay, N. (1998). 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev.* 12, 502–513.
239. Khaleghpour, K., Pyronnet, S., Gingras, A.-C., and Sonenberg, N. (1999). Translational Homeostasis: Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Control of 4E-Binding Protein 1 and p70 S6 Kinase Activities. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4302–4310.

240. Waskiewicz, A.J., Flynn, A., Proud, C.G., and Cooper, J.A. (1997). Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J.* *16*, 1909–1920. 10.1093/emboj/16.8.1909.
241. Pyronnet, S. (2000). Phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E by the MAPK-activated protein kinase Mnk1. *Biochem. Pharmacol.* *60*, 1237–1243. 10.1016/S0006-2952(00)00429-9.
242. Lejbkowitz, F., Goyer, C., Darveau, A., Neron, S., Lemieux, R., and Sonenberg, N. (1992). A fraction of the mRNA 5' cap-binding protein, eukaryotic initiation factor 4E, localizes to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 9612–9616.
243. Strudwick, S., and Borden, K.L.B. (2002). The emerging roles of translation factor eIF4E in the nucleus. *Differentiation* *70*, 10–22. 10.1046/j.1432-0436.2002.700102.x.
244. Rom, E., Kim, H.C., Gingras, A.-C., Marcotrigiano, J., Favre, D., Olsen, H., Burley, S.K., and Sonenberg, N. (1998). Cloning and Characterization of 4EHP, a Novel Mammalian eIF4E-related Cap-binding Protein*. *J. Biol. Chem.* *273*, 13104–13109. 10.1074/jbc.273.21.13104.
245. Morita, M., Ler, L.W., Fabian, M.R., Siddiqui, N., Mullin, M., Henderson, V.C., Alain, T., Fonseca, B.D., Karashchuk, G., Bennett, C.F., et al. (2012). A novel 4EHP-GIGYF2 translational repressor complex is essential for mammalian development. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 3585–3593. 10.1128/MCB.00455-12.
246. Uniacke, J., Holterman, C.E., Lachance, G., Franovic, A., Jacob, M.D., Fabian, M.R., Payette, J., Holcik, M., Pause, A., and Lee, S. (2012). An oxygen-regulated switch in the protein synthesis machinery. *Nature* *486*, 126–129. 10.1038/nature11055.
247. Osborne, M.J., Volpon, L., Kornblatt, J.A., Culjkovic-Kraljacic, B., Baguet, A., and Borden, K.L.B. (2013). eIF4E3 acts as a tumor suppressor by utilizing an atypical mode of methyl-7-guanosine cap recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 3877–3882. 10.1073/pnas.1216862110.

248. Hernández, G., Han, H., Gandin, V., Fabian, L., Ferreira, T., Zuberek, J., Sonenberg, N., Brill, J.A., and Lasko, P. (2012). Eukaryotic initiation factor 4E-3 is essential for meiotic chromosome segregation, cytokinesis and male fertility in *Drosophila*. *Dev. Camb. Engl.* *139*, 3211–3220. [10.1242/dev.073122](https://doi.org/10.1242/dev.073122).
249. Weiss, B., Allen, G.E., Kloehn, J., Abid, K., Jaquier-Gubler, P., and Curran, J.A. (2021). eIF4E3 forms an active eIF4F complex during stresses (eIF4FS) targeting mTOR and reprograms the transcriptome. *Nucleic Acids Res.* *49*, 5159. [10.1093/nar/gkab267](https://doi.org/10.1093/nar/gkab267).
250. Ptushkina, M., von der Haar, T., Karim, M.M., Hughes, J.M., and McCarthy, J.E. (1999). Repressor binding to a dorsal regulatory site traps human eIF4E in a high cap-affinity state. *EMBO J.* *18*, 4068–4075. [10.1093/emboj/18.14.4068](https://doi.org/10.1093/emboj/18.14.4068).
251. Fabbri, L., Chakraborty, A., Robert, C., and Vagner, S. (2021). The plasticity of mRNA translation during cancer progression and therapy resistance. *Nat. Rev. Cancer* *21*, 558–577. [10.1038/s41568-021-00380-y](https://doi.org/10.1038/s41568-021-00380-y).
252. Bhat, M., Robichaud, N., Hulea, L., Sonenberg, N., Pelletier, J., and Topisirovic, I. (2015). Targeting the translation machinery in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* *14*, 261–278. [10.1038/nrd4505](https://doi.org/10.1038/nrd4505).
253. De Benedetti, A., and Rhoads, R.E. (1990). Overexpression of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E in HeLa cells results in aberrant growth and morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 8212–8216. [10.1073/pnas.87.21.8212](https://doi.org/10.1073/pnas.87.21.8212).
254. Cormier, P., Pyronnet, S., Salaün, P., Mulner-Lorillon, O., and Sonenberg, N. (2003). Cap-dependent translation and control of the cell cycle. *Prog. Cell Cycle Res.* *5*, 469–475.
255. Silvera, D., Formenti, S.C., and Schneider, R.J. (2010). Translational control in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 254–266. [10.1038/nrc2824](https://doi.org/10.1038/nrc2824).
256. Mamane, Y., Petroulakis, E., Martineau, Y., Sato, T.-A., Larsson, O., Rajasekhar, V.K., and Sonenberg, N. (2007). Epigenetic Activation of a Subset of mRNAs by eIF4E Explains Its Effects on Cell Proliferation. *PLoS ONE* *2*, e242. [10.1371/journal.pone.0000242](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000242).

257. Koromilas, A.E., Lazaris-Karatzas, A., and Sonenberg, N. (1992). mRNAs containing extensive secondary structure in their 5' non-coding region translate efficiently in cells overexpressing initiation factor eIF-4E. *EMBO J.* *11*, 4153–4158.
258. Roux, P.P., and Topisirovic, I. (2012). Regulation of mRNA Translation by Signaling Pathways. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*, a012252. [10.1101/cshperspect.a012252](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012252).
259. Roux, P.P., and Topisirovic, I. (2018). Signaling Pathways Involved in the Regulation of mRNA Translation. *Mol. Cell. Biol.* *38*, e00070-18. [10.1128/MCB.00070-18](https://doi.org/10.1128/MCB.00070-18).
260. Lazaris-Karatzas, A., Smith, M.R., Frederickson, R.M., Jaramillo, M.L., Liu, Y.L., Kung, H.F., and Sonenberg, N. (1992). Ras mediates translation initiation factor 4E-induced malignant transformation. *Genes Dev.* *6*, 1631–1642. [10.1101/gad.6.9.1631](https://doi.org/10.1101/gad.6.9.1631).
261. Topisirovic, I., and Sonenberg, N. (2015). Translation and cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* *1849*, 751–752. [10.1016/j.bbagr.2015.05.004](https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.05.004).
262. Topisirovic, I., Guzman, M.L., McConnell, M.J., Licht, J.D., Culjkovic, B., Neering, S.J., Jordan, C.T., and Borden, K.L.B. (2003). Aberrant Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E-Dependent mRNA Transport Impedes Hematopoietic Differentiation and Contributes to Leukemogenesis. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 8992–9002. [10.1128/MCB.23.24.8992-9002.2003](https://doi.org/10.1128/MCB.23.24.8992-9002.2003).
263. Fernandez, P.C., Frank, S.R., Wang, L., Schroeder, M., Liu, S., Greene, J., Cocito, A., and Amati, B. (2003). Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev.* *17*, 1115–1129. [10.1101/gad.1067003](https://doi.org/10.1101/gad.1067003).
264. Lin, C.-J., Cencic, R., Mills, J.R., Robert, F., and Pelletier, J. (2008). c-Myc and eIF4F Are Components of a Feedforward Loop that Links Transcription and Translation. *Cancer Res.* *68*, 5326–5334. [10.1158/0008-5472.CAN-07-5876](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5876).
265. Guzman, M.L., Neering, S.J., Upchurch, D., Grimes, B., Howard, D.S., Rizzieri, D.A., Luger, S.M., and Jordan, C.T. (2001). Nuclear factor- κ B is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* *98*, 2301–2307. [10.1182/blood.V98.8.2301](https://doi.org/10.1182/blood.V98.8.2301).

266. Hariri, F., Arguello, M., Volpon, L., Culjkovic-Kraljacic, B., Nielsen, T.H., Hiscott, J., Mann, K.K., and Borden, K.L.B. (2013). The eukaryotic translation initiation factor eIF4E is a direct transcriptional target of NF- κ B and is aberrantly regulated in Acute Myeloid Leukemia. *Leukemia* 27, 2047–2055. 10.1038/leu.2013.73.
267. Volpon, L., Osborne, M.J., Culjkovic-Kraljacic, B., and Borden, K.L.B. (2013). eIF4E3, a new actor in mRNA metabolism and tumor suppression. *Cell Cycle Georget. Tex* 12, 1159–1160. 10.4161/cc.24566.
268. Huang, Q., Mo, J., Yang, H., Ji, Y., Huang, R., Liu, Y., and Pan, Y. (2023). Analysis of m7G-Related signatures in the tumour immune microenvironment and identification of clinical prognostic regulators in breast cancer. *BMC Cancer* 23, 583. 10.1186/s12885-023-11012-z.
269. Li, Z.W., Hua, Z., Ping, H.D., Jun, O.W., Shan, W.C., and Dong, T.G. (2023). The Potential Impact of EIF4E3 and LARP1 on Tumor Immunity in Hepatocellular Carcinoma. *Biomed. Environ. Sci.* 36, 469–475. 10.3967/bes2023.057.
270. Xu, X., Zhao, Y., Ying, Y., Zhu, H., Luo, J., Mou, T., and Zhang, Z. (2023). m7G-related genes-NCBP2 and EIF4E3 determine immune contexture in head and neck squamous cell carcinoma by regulating CCL4/CCL5 expression. *Mol. Carcinog.* 62, 1091–1106. 10.1002/mc.23548.
271. Landon, A.L., Muniandy, P.A., Shetty, A.C., Lehrmann, E., Volpon, L., Houng, S., Zhang, Y., Dai, B., Peroutka, R., Mazan-Mamczarz, K., et al. (2014). MNKs act as a regulatory switch for eIF4E1 and eIF4E3 driven mRNA translation in DLBCL. *Nat. Commun.* 5, 5413. 10.1038/ncomms6413.
272. 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.
273. Bagger, F.O., Sasivarevic, D., Sohi, S.H., Laursen, L.G., Pundhir, S., Søndersby, C.K., Winther, O., Rapin, N., and Porse, B.T. (2016). BloodSpot: a database of gene expression

- profiles and transcriptional programs for healthy and malignant haematopoiesis. *Nucleic Acids Res.* *44*, D917-924. 10.1093/nar/gkv1101.
274. Stec, M., Weglarczyk, K., Baran, J., Zuba, E., Mytar, B., Pryjma, J., and Zembala, M. (2007). Expansion and differentiation of CD14⁺CD16⁽⁻⁾ and CD14⁺ +CD16⁺ human monocyte subsets from cord blood CD34⁺ hematopoietic progenitors. *J. Leukoc. Biol.* *82*, 594–602. 10.1189/jlb.0207117.
275. Forester, C.M., Oses-Prieto, J.A., Phillips, N.J., Miglani, S., Pang, X., Byeon, G.W., DeMarco, R., Burlingame, A., Barna, M., and Ruggero, D. (2022). Regulation of eIF4E guides a unique translational program to control erythroid maturation. *Sci. Adv.* *8*, eadd3942. 10.1126/sciadv.add3942.
276. Jensen, K.B., Dredge, B.K., Toubia, J., Jin, X., Iadevaia, V., Goodall, G.J., and Proud, C.G. (2021). capCLIP: a new tool to probe translational control in human cells through capture and identification of the eIF4E-mRNA interactome. *Nucleic Acids Res.* *49*, e105. 10.1093/nar/gkab604.
277. Récher, C., Beyne-Rauzy, O., Demur, C., Chicanne, G., Dos Santos, C., Mas, V.M.-D., Benzaquen, D., Laurent, G., Huguet, F., and Payrastre, B. (2005). Antileukemic activity of rapamycin in acute myeloid leukemia. *Blood* *105*, 2527–2534. 10.1182/blood-2004-06-2494.
278. Joshi, S., and Plataniias, L.C. (2014). Mnk kinase pathway: Cellular functions and biological outcomes. *World J. Biol. Chem.* *5*, 321–333. 10.4331/wjbc.v5.i3.321.
279. Kosciuczuk, E.M., Kar, A.K., Blyth, G.T., Fischietti, M., Abedin, S., Mina, A.A., Siliezar, R., Rzymiski, T., Brzozka, K., Eklund, E.A., et al. (2019). Inhibitory effects of SEL201 in acute myeloid leukemia. *Oncotarget* *10*, 7112–7121. 10.18632/oncotarget.27388.
280. Altman, J.K., Szilard, A., Konicek, B.W., Iversen, P.W., Kroczyńska, B., Glaser, H., Sassano, A., Vakana, E., Graff, J.R., and Plataniias, L.C. (2013). Inhibition of Mnk kinase activity by cercosporamide and suppressive effects on acute myeloid leukemia precursors. *Blood* *121*, 3675. 10.1182/blood-2013-01-477216.

281. Mazewski, C., and Plataniias, L.C. (2023). MNK Proteins as Therapeutic Targets in Leukemia. *OncoTargets Ther.* *16*, 283–295. 10.2147/OTT.S370874.
282. Altman, J.K., Glaser, H., Sassano, A., Joshi, S., Ueda, T., Watanabe-Fukunaga, R., Fukunaga, R., Tallman, M.S., and Plataniias, L.C. (2010). Negative regulatory effects of Mnk kinases in the generation of chemotherapy-induced antileukemic responses. *Mol. Pharmacol.* *78*, 778–784. 10.1124/mol.110.064642.
283. Li, P., Diab, S., Yu, M., Adams, J., Islam, S., Basnet, S.K.C., Albrecht, H., Milne, R., and Wang, S. (2016). Inhibition of Mnk enhances apoptotic activity of cytarabine in acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget* *7*, 56811–56825. 10.18632/oncotarget.10796.
284. Kosciuczuk, E.M., Saleiro, D., Kroczyńska, B., Beauchamp, E.M., Eckerdt, F., Blyth, G.T., Abedin, S.M., Giles, F.J., Altman, J.K., and Plataniias, L.C. (2016). Merestinib blocks Mnk kinase activity in acute myeloid leukemia progenitors and exhibits antileukemic effects in vitro and in vivo. *Blood* *128*, 410–414. 10.1182/blood-2016-02-698704.
285. Yan, S.B., Peek, V.L., Ajamie, R., Buchanan, S.G., Graff, J.R., Heidler, S.A., Hui, Y.-H., Huss, K.L., Konicek, B.W., Manro, J.R., et al. (2013). LY2801653 is an orally bioavailable multi-kinase inhibitor with potent activity against MET, MST1R, and other oncoproteins, and displays anti-tumor activities in mouse xenograft models. *Invest. New Drugs* *31*, 833–844. 10.1007/s10637-012-9912-9.
286. Reich, S.H., Sprengeler, P.A., Chiang, G.G., Appleman, J.R., Chen, J., Clarine, J., Eam, B., Ernst, J.T., Han, Q., Goel, V.K., et al. (2018). Structure-based Design of Pyridone–Aminal eFT508 Targeting Dysregulated Translation by Selective Mitogen-activated Protein Kinase Interacting Kinases 1 and 2 (MNK1/2) Inhibition. *J. Med. Chem.* *61*, 3516–3540. 10.1021/acs.jmedchem.7b01795.
287. Nishioka, C., Ikezoe, T., Yang, J., and Yokoyama, A. (2009). Inhibition of MEK signaling enhances the ability of cytarabine to induce growth arrest and apoptosis of acute myelogenous leukemia cells. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* *14*, 1108–1120. 10.1007/s10495-009-0372-4.

288. Hou, J., Lam, F., Proud, C., and Wang, S. (2012). Targeting Mnks for cancer therapy. *Oncotarget* 3, 118–131. 10.18632/oncotarget.453.
289. Saez, B., Walter, M.J., and Graubert, T.A. (2017). Splicing factor gene mutations in hematologic malignancies. *Blood* 129, 1260–1269. 10.1182/blood-2016-10-692400.
290. Ueda, T., Sasaki, M., Elia, A.J., Chio, I.I.C., Hamada, K., Fukunaga, R., and Mak, T.W. (2010). Combined deficiency for MAP kinase-interacting kinase 1 and 2 (Mnk1 and Mnk2) delays tumor development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 13984–13990. 10.1073/pnas.1008136107.
291. Landon, A.L., Muniandy, P.A., Shetty, A.C., Lehrmann, E., Volpon, L., Houng, S., Zhang, Y., Dai, B., Peroutka, R., Mazan-Mamczarz, K., et al. (2014). MNKs act as a regulatory switch for eIF4E1 and eIF4E3 driven mRNA translation in DLBCL. *Nat. Commun.* 5, 5413. 10.1038/ncomms6413.
292. Kosciuczuk, E.M., Saleiro, D., and Platanias, L.C. (2017). Dual targeting of eIF4E by blocking MNK and mTOR pathways in leukemia. *Cytokine* 89, 116–121. 10.1016/j.cyto.2016.01.024.
293. Nepstad, I., Hatfield, K.J., Grønningsæter, I.S., and Reikvam, H. (2020). The PI3K-Akt-mTOR Signaling Pathway in Human Acute Myeloid Leukemia (AML) Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 2907. 10.3390/ijms21082907.

Titre : Implication du facteur d'initiation de la traduction eIF4E3 dans l'hématopoïèse normale et dans la leucémie aiguë myéloïde

Mots clés : hématopoïèse, Synthèse protéique, Traduction des ARNm, Leucémie aiguë méyloïde

Résumé : Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont des hémopathies malignes caractérisées par une dérégulation de l'hématopoïèse. Les altérations (translocations chromosomiques et/ou mutations) conduisent à un blocage de la différenciation cellulaire, une prolifération clonale accrue et une accumulation de blastes myéloïdes dans la moelle osseuse et le sang. Il en résulte une absence de cellules matures et fonctionnelles permettant l'équilibre du tissu hématopoïétique. Afin d'identifier les acteurs pouvant être impliqués dans le développement des LAM, un séquençage de l'ARN incluant des échantillons normaux ainsi que des échantillons de patients atteints de LAM a été réalisé. L'expression de tous les facteurs régulant la synthèse protéique (initiation, élongation et terminaison de la traduction) et de tous les acteurs des voies de signalisation qui contrôlent leurs activités ont été scrutés. Parmi eux, les deux facteurs eIF4E1 et eIF4E3 ont attiré notre attention. Ils appartiennent à la famille eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E) des facteurs d'initiation de la traduction qui régulent la traduction coiffe-dépendante des ARNm. L'initiation de la traduction est régulée par les voies de signalisation des MAPK et PI3K/AKT/mTOR. eIF4E1, un facteur bien connu, joue un rôle dans la survie et la prolifération des cellules normales et cancéreuses alors que eIF4E3 est peu décrit. L'objectif de ce projet a été de démontrer l'implication du facteur d'initiation eIF4E3 dans l'hématopoïèse normale et dans la LAM. D'après nos données, le facteur d'initiation de la traduction eIF4E3 participe à la différenciation des cellules hématopoïétiques en monocytes. Chez les patients atteints de LAM, son expression variable et dérégulée semble participer aux processus oncogéniques. De plus une forte expression d'eIF4E3 participe à la résistance des blastes leucémiques aux inhibiteurs de mTOR. En revanche, l'utilisation de différents inhibiteurs de la kinase MNK présente des effets divergents sur la différenciation monocyttaire. De plus, l'analyse du traductome d'eIF4E3 et d'eIF4E1 est essentielle afin d'identifier les ARNm cibles traduits par ces deux facteurs. Cela pourrait également suggérer des ARNm dont les protéines seraient potentiellement impliquées dans le développement des LAM. L'ensemble de ces résultats est un premier pas dans la compréhension et la caractérisation du facteur d'initiation de la traduction eIF4E3. Comprendre les fonctions de ce facteur impliqué dans la différenciation hématopoïétique devient essentiel et pourrait permettre une meilleure prise en charge thérapeutique des patients.

Title: Implication of the translation initiation factor eIF4E3 in normal haematopoiesis and acute myeloid leukemia

Key words: mRNA translation, hematopoiesis, Protein synthesis, acute myeloid leukemia

Abstract: Acute myeloid leukaemias (AML) are haematological malignancies characterised by deregulation of haematopoiesis. Alterations (chromosomal translocations and/or mutations) lead to a block in cell differentiation, increased clonal proliferation and an accumulation of myeloid blasts in the bone marrow and blood. The result is a lack of mature, functional cells to balance the haematopoietic tissue. In order to identify the players that may be involved in the development of AML, RNA sequencing was carried out on normal samples and samples from patients with AML. The expression of all the factors regulating protein synthesis (initiation, elongation and termination of translation) and of all the players in the signalling pathways controlling their activities were examined. Among them, the two factors eIF4E1 and eIF4E3 caught our attention. They belong to the eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E) family of translation initiation factors that regulate the cap-dependent translation of mRNAs. Translation initiation is regulated by the MAPK and PI3K/AKT/mTOR signalling pathways. eIF4E1, a well-known factor, plays a role in the survival and proliferation of normal and cancerous cells, whereas eIF4E3 is little described. The aim of this project was to demonstrate the involvement of the eIF4E3 initiation factor in normal haematopoiesis and in AML. According to our data, the translation initiation factor eIF4E3 is involved in the differentiation of haematopoietic cells into monocytes. In patients with AML, its variable and deregulated expression appears to be involved in oncogenic processes. In addition, high expression of eIF4E3 is involved in the resistance of leukaemic blasts to mTOR inhibitors. On the other hand, the use of different MNK kinase inhibitors has divergent effects on monocyte differentiation. In addition, translational analysis of eIF4E3 and eIF4E1 is essential to identify the target mRNAs translated by these two factors. This could also suggest mRNAs whose proteins are potentially involved in the development of AMLs. Taken together, these results represent a first step towards understanding and characterising the translation initiation factor eIF4E3. Understanding the functions of this factor involved in haematopoietic differentiation is becoming essential and could lead to better therapeutic management of patients.