



HAL
open science

Le fer mitochondrial acteur de la résistance dans les leucémies aiguës myéloïdes

Estelle Saland

► **To cite this version:**

Estelle Saland. Le fer mitochondrial acteur de la résistance dans les leucémies aiguës myéloïdes. Sciences du Vivant [q-bio]. 2022. hal-03908703

HAL Id: hal-03908703

<https://ephe.hal.science/hal-03908703>

Submitted on 20 Dec 2022

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.



École Pratique
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences et Vie de la Terre

Mémoire présenté par

Estelle SALAND

Le 18 novembre 2022

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

Le fer mitochondrial acteur de la résistance dans les leucémies aiguës myéloïdes

Laboratoire de recherche :

CRCT- Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (Inserm U1037)

Equipe METAML - 2 avenue Hubert Curien, 31024 Toulouse cedex

Devant le jury suivant :

Rapporteur : Arnaud Mourier

Examinatrice : Carole Peyssonnaud

Présidente : Catherine Paul

Tutrice pédagogique : Sylvie Demignot

Tuteur scientifique : Jean-Emmanuel Sarry

Mémoire préparé sous la direction de:

Jean-Emmanuel Sarry

et de:

Sylvie Demignot



Remerciements

Aux docteurs **Arnaud Mourier**, **Carole Peyssoneaux** et **Catherine Paul** de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury. Je suis honorée de vous partager ce travail et suis certaine que les discussions autour de celui-ci vont être passionnantes. J'ai hâte de vous présenter l'ensemble.

Sylvie Demignot, un merci tout particulier pour cet encadrement pédagogique. Votre accompagnement, du choix des unités d'enseignement à la rédaction du mémoire, a permis d'améliorer considérablement la qualité de ce travail.

Jean-Emmanuel, Merci pour toutes ces années de collaboration et merci de me partager ta passion sans failles pour la science ! Il n'y a rien de meilleur que de participer à repousser chaque jour un peu plus les limites de la connaissance du monde qui nous entoure... Et c'est un travail d'équipe ! Merci de me faire confiance et de toujours m'amener au-delà de mes limites.

Merci à l'ensemble de l'équipe clinique. **François** et **Marie-Laure**, j'ai eu plaisir à partager un bout de chemin avec vous. Ce travail ne serait pas le même sans un passage par le plateau où vous m'avez tout appris de la cytométrie. Le nombre impressionnant de patients inclus dans ce projet améliore considérablement la qualité du travail. Merci mille fois de faire partie de cette aventure ! C'est un réel plaisir de travailler avec vous.

A toute l'équipe 18 présente ou passée, que de belles rencontres... Quelle équipe formidable ! Je vous remercie tous de votre bonne humeur quotidienne qui permettent de passer toutes les dissections en musique, avec parfois des petites chorées et beaucoup d'histoires ! Que ce soit en culture, dans le L2, dans les bureaux, à la pause goûter on en oublie presque que nous sommes au travail et ça rend la tâche plus facile !

Aux dinosaures de ce labo, de belles amitiés se sont créées et pas des moindres ! **Fabienne**, **Sarah**, **Marion**, **Nizar**, **Clément**, vous êtes partis il y a bien longtemps mais c'est toujours une immense joie de vous revoir ! Quand on pense au point de départ de cette aventure autour de la LAM nous étions loin d'imaginer que j'en arriverai là... ET c'est un peu, grâce à vous. J'espère que nous aurons encore plein de belles histoires ensemble.

Comment ne pas penser à tous les « copains du labo », **Marie**, **Lucille**, **Guigui**, **Claudie**, **Mathilde**, **Toto** qui sont partis vers d'autres aventures mais sans qui je n'aurai certainement pas entrepris tout ça. Vous êtes les Meilleurs !!! Votre passion sans faille, votre collectif hors du commun, vos musiques parfois très éclectiques, nos discussions politiques et écologiques, vos différences. Qu'est-ce que j'ai pu apprendre avec vous ! Vous étiez une équipe hors du commun. Vous êtes tous fantastiques et j'espère que nous partagerons encore de belles aventures ensemble. Soyez heureux et prenez soin de vous !

A toute l'équipe actuelle, un peu dans le désordre :

Gonçalo, merci pour ta patience ! Pour ce diplôme je t'ai abandonné pendant 2 mois durant ton M2. Merci d'avoir tenu la barre ! Je t'ai fait entrer dans le monde du fer et espère que ça t'a plu. En tout cas à très vite sur la route p53 !

Emeline, tes chansons... Parfois je me surprends à chanter la dernière que tu m'as mise dans la tête quand je suis en culture. Ton naturel, ton entrain et ta passion font de toi une collègue indispensable !

Ambrine, te voilà entrée dans les ITA qui reprennent un cursus universitaire. Fais toi confiance, ne te dévalorise pas. Tu le mérites et tu peux le faire ! Une chose est sûre, ton arrivée dans la labo nous a amené un peu de rigueur et une maîtrise des modèles animaux que nous n'avions pas ! Bien joué ! Ce n'était pas facile de faire évoluer les vieux dinos...

Léa, des pauses du goûter aux soirées que nous avons pu faire je suis certaine que tu es une collègue au top qui mérite d'être connue ! J'ai hâte de mieux te découvrir.

Laura P, une longue collaboration commence ! C'est un plaisir de travailler avec toi. Merci pour tous ces petits échanges qui me font souvent voir les projets sous un angle différent. Nous aurons l'occasion de partager quelques manips sur des Black et avec les blagues de Nathan et Emeline ça ne sera que plus drôle 😊

Nathan, Mon dieu tes blagues tombes parfois à point ! Et j'espère bien que nous aurons bien plus d'occasions de travailler ensemble... Au détour d'un ficoll, d'un FACS, ou d'un western (fais pas semblant tu kiffe !) c'est un réel plaisir de t'avoir dans le bureau. Je te souhaite une très belle thèse ! Ça va être magnifique !

Charly, tu as rejoint notre équipe beaucoup trop tard mais t'es beaucoup trop drôle ! J'ai été ravie de partager ce moment de rédaction avec Nathan et toi ! Dernière ligne droite pour toi, avec les références du roi de la chloroquine c'est sur elle va être exceptionnelle ! On maintiens notre pacte de non rangement du bureau?!

Laura (Lauturette), que dire?! Notre amitié commune pour Guillaume m'a permis de te découvrir et tu es une personne hors du commun avec qui j'apprécie partager une bière, une discussion, une soirée et tant d'autre. Tes histoires, ton accent, tes blagues Pom' potes et j'en passe font de toi une personne INCROYABLE ! Tu crois en tes valeurs et c'est ce qu'il y a de plus beau. Ne te perds pas dans ce monde de fous, et crois en toi ! T'es au TOOOP !

Charlotte, T'es beaucoup trop rigolote! Chaque moment n'est que rire. Merci pour ta joie. T'entendre la matin amène la bonne humeur au labo. Et comme tu le sais déjà je suis toujours partante pour

partager un verre (d'ice tea !) ! Aller bourrique, pousse aussi fort que t'est bête pour faire de tes deux thèses un moment incroyable !

Margaux, mais que de gens drôles dans cette équipe ! Tu fais partie de ces personnes avec qui on aime partager une soirée, une rando ou travailler. Avec MatMat vous êtes un duo fantastique et ça va te permettre j'en suis certaine de faire une super thèse ! Et pour ces trois années, on te garde une place en chambre froide pour te rappeler le climat Strasbourgeois 😊

Mathieu, toujours présent pour sonner l'heure du goûter, et c'est ça qu'on aime ! Sans oublier ces heures interminables de culture... Ces moments de convivialités sont indispensables ! Autour d'une idée, d'une galère manip, d'une blague, l'esprit d'équipe résout tous les problèmes.

Alexis, quelle arrivée fracassante dans l'équipe ! Tu prends toute la place dans les incub'. A quand le script qui va faire les manips tout seul ? En tout cas, ça m'a fait plaisir de t'apprendre un peu les manips au labo'.

Jean, RESTORE te garde un peu trop, nous te voyons que trop peu... N'hésite pas à venir nous faire un petit coucou ou à nous proposer un petit verre. Je serai là !

Carine, ça en fait des années de collaboration ! Presque autant que ton iphone mais avec les mises à jour... C'est toujours un plaisir d'avoir ton dynamisme parmi nous. Merci pour tes relectures et tes conseils. Et pourquoi pas un peu de ferritinophagie ?!

Latifa, la science prends du temps... Mais comme dirait Katya courage et persévérance ! Bientôt tu auras toutes les clés pour participer pleinement à toutes ces belles histoires.

Margherita, il nous manquait d'un accent italien pour amener un peu de soleil au labo. Et puis PTBP1 est bien plus solaire prononcé par toi...

Nathaniel, ah t'as vu ça, toutes les routes mènent au fer ! Je suis curieuse de voir tes datas !

Sans oublier les collaborateurs de cette histoire. **Manon**, **Laëtitia**, **Nathalie**, **Thimoté**, que ferions-nous sans vos expertises ?! Tous vos conseils et nos échanges n'ont fait que pousser un peu plus loin les possibilités pour répondre aux questions de ce travail. Au magasin, **Joël** et **Katya**, sans vous notre travail serait bien plus compliqué ! Vous distribuez du bonheur ! Avec vous c'est un peu Noël tous les jours...

Je ne saurai oublier **Jean-Marc Latour** du CEA pour les analyses de mes ironomes appelés aussi par les personnes du labo «marmites de cellules »

Les aventures humaines sont les plus belles. Je remercie alors ma famille et mes amis de me soutenir. Chacun a posé sa petite pierre à cet édifice en me soutenant, me supportant, m'aidant, me distrayant. Sans vous je n'aurai pas eu cette audace !

Table des matières

Table des matières	2
Table des illustrations	4
Liste des tableaux	5
Liste des abréviations	6
Introduction	8
I. <i>Les leucémies aiguës myéloïdes</i>	8
1.1. L'hématopoïèse normale et leucémique	8
1.2. Le pronostic et la prise en charge	9
II. <i>La mitochondrie carrefour métabolique et rôle dans la résistance des leucémies aiguës myéloïdes</i>	11
Le cancer : une maladie métabolique ?	11
La mitochondrie	12
Le métabolisme dans la résistance thérapeutique	17
III. <i>L'homéostasie du fer</i>	19
L'homéostasie du fer cellulaire et mitochondrial	19
La synthèse des motifs Fer-Soufre	20
La biosynthèse des hèmes	22
Le fer régulateur du stress oxydant	24
L'homéostasie du fer marqueur pronostique dans les LAM et régulateur de la différenciation hématopoïétique ..	25
IV. <i>Les macrophages, senseurs du fer et régulateurs de la résistance thérapeutique</i>	28
Les macrophages.....	28
Les macrophages associés aux tumeurs	29
Les macrophages et la régulation du fer.....	31
Hypothèse et objectifs	33
Matériels et méthodes	35
I. <i>Réactifs</i>	35
Drogues et molécules :.....	35
Anticorps de western blot :	35
Anticorps de cytométrie :	35
II. <i>Les modèles d'étude</i>	36
Culture cellulaire de cellules de LAM	36
Culture cellulaire de macrophages	36
Xénogreffe de LAM dans des souris NSG	37
Immunohistochimie :	37
Transfection siRNA par électroporation avec le système Néon.....	37
III. <i>Méthodes d'analyse de la sensibilité cellulaire et d'expression des protéines</i>	38
Quantification de la viabilité cellulaire et de l'apoptose	38
Purification des mitochondries	38
Mesure de la peroxydation des lipides : Bodipy-C11	38
Sensibilité des cellules aux molécules.....	39
Expression protéique par western blot.....	39
Préparation d'extraits pour les analyses protéomiques	39
Dosage multiplexé des cytokines par cytométrie en flux	39
Dosage d'ELT dans le plasma des souris	41
IV. <i>Méthodes de caractérisation de l'homéostasie du fer</i>	41

Expression de la Ferritine FTH1 en cytométrie de flux	41
Quantification de la protoporphyrin IX en cytométrie de flux.....	41
Mesure du fer libre intracellulaire par cytométrie de flux.....	42
Echantillonnage pour quantification du fer intracellulaire par spectroscopie de Mössbauer.....	42
V. Méthodes d'étude du métabolisme cellulaire.....	43
Analyses métabolomiques :	43
Mesure des sites de production de l'ATP.....	43
Mesure de la respiration cellulaire par Seahorse	43
Mesure du métabolisme énergétique par cytométrie de flux : méthode Scénith.....	44
Mesure du potentiel de membrane mitochondrial et de la masse mitochondriale par cytométrie de flux	46
Mesure du statut redox par cytométrie de flux : DCF-DA.....	46
Mesure des activités enzymatiques :	46
Résultats.....	49
<i>Partie 1 – Eltrombopag chélate le fer mitochondrial dans les LAM</i>	<i>49</i>
ELT induit de la mort cellulaire dans les LAM	49
ELT affecte la voie de biosynthèse des Fe-S.....	51
<i>Partie 2 – Le fer mitochondrial est impliqué dans la résistance à l'AraC.....</i>	<i>56</i>
Le fer participe à la résistance à l'AraC	56
La voie de biosynthèse des hèmes et des Fe-S participe à la résistance à l'AraC	58
<i>Partie 3 : ELT inhibe la fonction OxPHOS et restaure la sensibilité à l'AraC des cellules de LAM.</i>	<i>61</i>
La chélation du fer mitochondrial avec ELT modifie le métabolisme cellulaire.....	61
Chélater le fer mitochondrial avec ELT inhibe l'augmentation de la fonction OxPHOS par AraC.....	63
ELT sensibilise à l'AraC mais pas à l'Ida.....	64
<i>Partie 4 – Les macrophages participent à l'augmentation du fer dans les cellules résiduelles.....</i>	<i>67</i>
Le microenvironnement médullaire participe à l'augmentation du fer mitochondrial en réponse à l'AraC.....	67
Les macrophages modifient le contenu en fer des blastes leucémiques	68
L'AraC impacte le contenu et l'activation des macrophages dans les moelles osseuses	70
<i>Partie 5 - Cibler le métabolisme du fer comme une solution thérapeutique pour les patients de mauvais pronostic ...</i>	<i>73</i>
Le statut mutationnel prédictif de la réponse à la combinaison AraC/ELT.....	73
Discussion et perspectives	76
<i>I. Le fer mitochondrial : un cofacteur essentiel à la biologie des LAM ?.....</i>	<i>76</i>
<i>II. Les macrophages régulateurs de la disponibilité en fer ?.....</i>	<i>77</i>
<i>III. Cibler le fer mitochondrial : une cible thérapeutique prometteuse pour les patients porteurs de la mutation p53 ?</i>	<i>79</i>
<i>IV. Cibler le fer mitochondrial une stratégie thérapeutique à adapter ?.....</i>	<i>79</i>
Conclusion	81
Bibliographie	83
Annexes.....	92
<i>Annexe 1 : Différenciation des macrophages in vitro, expression des marqueurs</i>	<i>92</i>
<i>Annexe 2 : Essai clinique EPAG-2015.....</i>	<i>93</i>

Table des illustrations

Figure 1: L'hématopoïèse et hémopathies associées.....	8
Figure 2 – Amélioration de la prise en charge dans les leucémies aiguës myéloïdes.....	9
Figure 3- Le métabolisme central.....	11
Figure 4 : Fonctions mitochondriales	13
Figure 5: Activité des complexes de la chaîne respiratoire et cofacteurs.....	15
Figure 6: Implication de la mitochondrie dans les mécanismes de mort cellulaire.	16
Figure 7: inhibiteurs de l'activité mitochondriale	17
Figure 8: Homéostasie du fer cellulaire.....	20
Figure 9: Synthèse des protéines Fe-S.....	21
Figure 10: Localisation et fonction des protéines Fe-S.....	21
Figure 11: Système de traduction des éléments de réponse au fer	22
Figure 12: Voie de biosynthèse de l'hème	23
Figure 13 - Régulation des dérivés réactifs de l'oxygène	24
Figure 14: Dérégulation du fer systémique dans les leucémies aiguës myéloïdes: renfort de la résistance thérapeutique?.....	26
Figure 15: Voies d'activation et de polarisation des macrophages.....	28
Figure 16; Impact de la polarisation des macrophages sur le microenvironnement.....	30
Figure 17: Les macrophages régulent le fer du microenvironnement.....	32
Figure 18: Etapes de la purification de mitochondries par centrifugation différentielle.....	38
Figure 19: Analyse des cytokines par méthode multiplexée en cytométrie de flux	40
Figure 20: Flux d'incorporation de PpIX : activité de la voie de biosynthèse des hèmes.....	42
Figure 21: Tracé de respiration cellulaire par Seahorse.....	44
Figure 22: Mesure du métabolisme par cytométrie de flux.....	45
Figure 23: principe de mesure des activités enzymatiques	48
Figure 24: ELT induit de la mort dans les cellules de LAM	50
Figure 25: ELT tue les cellules de LAM par induction d'apoptose mitochondriale	51
Figure 26: ELT protège de la ferroptose	51
Figure 27: ELT est un chélateur rapide du fer intracellulaire	52
Figure 28: ELT chélate le fer mitochondrial.....	53
Figure 29: ELT impacte les enzymes mitochondriales de la voie de biosynthèse des hèmes.....	53
Figure 30: ELT inhibe l'assemblage des motifs Fe-S	54
Figure 31: ELT inhibe l'homéostasie du fer mitochondrial dans les cellules de LAM.....	55
Figure 32: Le fer cellulaire participe à la résistance à l'AraC.....	56
Figure 33: AraC augmente le fer dans les moelles osseuses de PDXs de LAM.....	57
Figure 34: Le fer mitochondrial est augmenté dans les cellules persistantes à l'AraC	58
Figure 35: La biosynthèse des hèmes et des Fe-S participe à la résistance à l'AraC.....	59
Figure 36: ELT affecte le métabolisme énergétique des cellules de LAM	62
Figure 37: ELT affecte la biogénèse mitochondriale	63
Figure 38: La chélation du fer mitochondrial par ELT bloque l'adaptation métabolique en réponse à l'AraC.	64
Figure 39: ELT synergise avec AraC mais pas avec Ida.	65
Figure 40: ELT potentialise la réponse à l'AraC in vivo.....	66
Figure 41: Ex vivo, l'AraC n'induit pas d'augmentation du fer mitochondrial dans les blastes leucémiques ...	67
Figure 42: Le microenvironnement de la moelle osseuse appuie la demande en fer des cellules leucémiques	68
Figure 43: Les blastes leucémiques impactent le nombre de macrophages in vitro.	69
Figure 44: Les macrophages M2 soutiennent la résistance à l'AraC in vitro.	69
Figure 45: Le phénotype des macrophages en réponse à l'AraC in vivo.....	70
Figure 46: L'AraC modifie la sécrétion de cytokines inflammatoires in vivo.....	71
Figure 47: Combinaison ELT/AraC: une réponse différentielle suivant le statut mutationnel?	74

Figure 48: ELT inhibe la persistance à l'AraC des blastes leucémiques..... 82

Liste des tableaux

Tableau 1- Caractéristiques des chélateurs du fer possédant une autorisation de mise sur le marché	27
Tableau 2: Activation et diversité phénotypique, transcriptionnelle, métabolique et sécrétoire des macrophages humains suivant leur polarisation	29
Tableau 3: Caractéristiques des lignées de LAM utilisées	36

Liste des abréviations

#

2-3PG · 2,3-phosphoglycérate
2-HG · 2-hydroxyglutarate
7-AAD · 7-Aminodactinomycine D

A

AA · Antimycine A
ADN · Acide désoxyribonucléique
ADP · Adénosine diphosphate
ALA · Acide 5-aminolévulinique
ALAD · Delta-aminolévulinate deshydratase
ALAS · ALA synthase
ANT · Adenine nucleotide translocator (protéine)
AraC · Aracytine ou Cytarabine
ARNm · Acide ribonucléique messenger
ATP · Adénosine triphosphate

B

BIP · Bipyridyl
BSA · Albumine de sérum bovin (*bovine serum albumine*)
BSA-FAF · BSA sans acides gras

C

CAT · Catalase
CCCP · Carbonylcyanure m-chlorophénylhydrazone
CD71 · Cluster de différenciation 71 (TfRC)
Ci · Index de combinaison
CIA · Machinerie cytosolique d'assemblage des motifs fer-souffre (*cytosolic iron-sulfur cluster assembly*)
cis-aco · Cis-aconitate
CLDX · Xénogreffe établie à partir de lignées cellulaires (Cell line derived xenograft)
CMF · Cytométrie de flux
CoQ · Coenzyme Q
CSH · Cellule souche hématopoïétique
cyt c · Cytochrome c

D

DHODH · Dihydroorotate déshydrogénase
DNR · Daunorubicine

E

ECL · Substrat électrochemoluminescent
ELN · European Leukemia Net (classification LAM)
ELT · Eltrombopag
EPO · Erythropoïétine
ETC · Chaîne de transport des électrons
Ex/Em: Longueurs d'ondes Excitation/Emission

F

FAB · French American British (classification LAM)
FAC · Ferric ammonium citrate
FECH · Ferrochélatase
Fe-S · Fer-Souffre
FPN · Ferroportine
Fru6P · Fructose-6-phosphate
FTH1 · Ferritine chaîne lourde
FTL · Ferritine chaîne légère
FTMT · Ferritine mitochondriale
FXN · Frataxine

G

glc6P · Glucose-6-phosphate
GSH · Glutathion

H

HE · Coloration Hematoxyline et Eosine
HIF · Hypoxia-inducible factors
HK2 · Hexokinase 2
HMB · Hydroxymethylbilane
HMBS · Hydroxymethylbilane synthase
HO-1 · Hème oxygénase-1
Hr · Harringtonin

I

i.p · Injection intra-péritonéale
IDA · Idarubicine
IDH · Isocitrate déshydrogénase
IRE · Element de réponse au fer (*Iron responsive element*)
IRP · Protéine de réponse au fer (*Iron responsive protein*)
ISC · Machinerie d'assemblage des motifs fer-souffre (iron-sulfur cluster)
ISCU · Iron-sulfur cluster assembly enzyme

L

LAM · Leucémie aiguë myéloïde
LIP · Pool de fer libre
LC-MS · Chromatographie liquide-spectrométrie de masse
LT · Lymphocyte T

M

M/mL · Million/millilitre
MFI · Intensité de fluorescence
MFRN · Mitoferrine
min · Minute
MTG · Mitotracker green

N

NAD · Nicotinamide adenine dinucleotide
NOS · Nitric oxide synthase

O

Oligo · Oligomycine
OxPHOS · Oxydations phosphorylantes

P

PBG · Porphobilinogen
PBGD · Porphobilinogen déaminase
PBMC · Cellules mononucléées de sang périphérique
PDH · Pyruvate déshydrogénase
PDX · Xénogreffe établie à partir de cellules de patient
(patient derived xenograft)
PIH · Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone
PpIX · Protoporphyrine IX
PPP · Voie des pentoses phosphates
Puro · Puromycine

R

RLU · Unité relative de luminescence
RMN · Résonance magnétique nucléaire
ROS · Espèces réactives de l'oxygène
Rot · Roténone
RPM · Rotation par minute

S

SA · Succinylacetone
SDH · Succinate déshydrogénase
siRNA · ARN interférant (*Small interfering RNA*)
SMD · Syndrome myélodysplasique
SOD · Superoxyde dismutase
SVF · Sérum de veau foetal

T

TCA · Cycle de l'acide citrique (ou cycle de Krebs)
Tf · Transferrine
TfRC · Récepteur à la transferrine
TMRE · Tetramethylrhodamine, ethyl ester
TPO · Thrombopoïétine

U

UROD · Uroporphyrinogen décarboxylase
UROS · Uroporphyrinogen III synthase

V

VDAC · Voltage-dependent anion channel
Ven · Venetoclax (ABT-199)

α

α-KG · α-cétoglutarate

β

β-ox · β-oxydation des acides gras

Introduction

I. Les leucémies aiguës myéloïdes

1.1. L'hématopoïèse normale et leucémique

L'hématopoïèse regroupe l'ensemble des processus qui conduisent à la formation des cellules de la moelle osseuse et du sang. La cellule souche hématopoïétique s'engage dans les voies de différenciation myéloïde ou lymphoïde. Ces deux voies de l'hématopoïèse sont régulées par des cytokines et des facteurs de croissance et conduisent *in fine* à la production de l'ensemble des cellules sanguines (dont les plaquettes, érythrocytes, lymphocytes). Les dérégulations de ces voies de différenciation conduisent à des hémopathies (**Figure 1**). Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont un groupe hétérogène d'hémopathies malignes. Elles sont induites par un blocage en différenciation dans la lignée myéloïde qui conduit à une accumulation de cellules immatures dans la moelle osseuse des patients appelées « blastes ». L'inhibition de l'hématopoïèse normale par les cellules leucémiques provoque des cytopénies et des anémies.

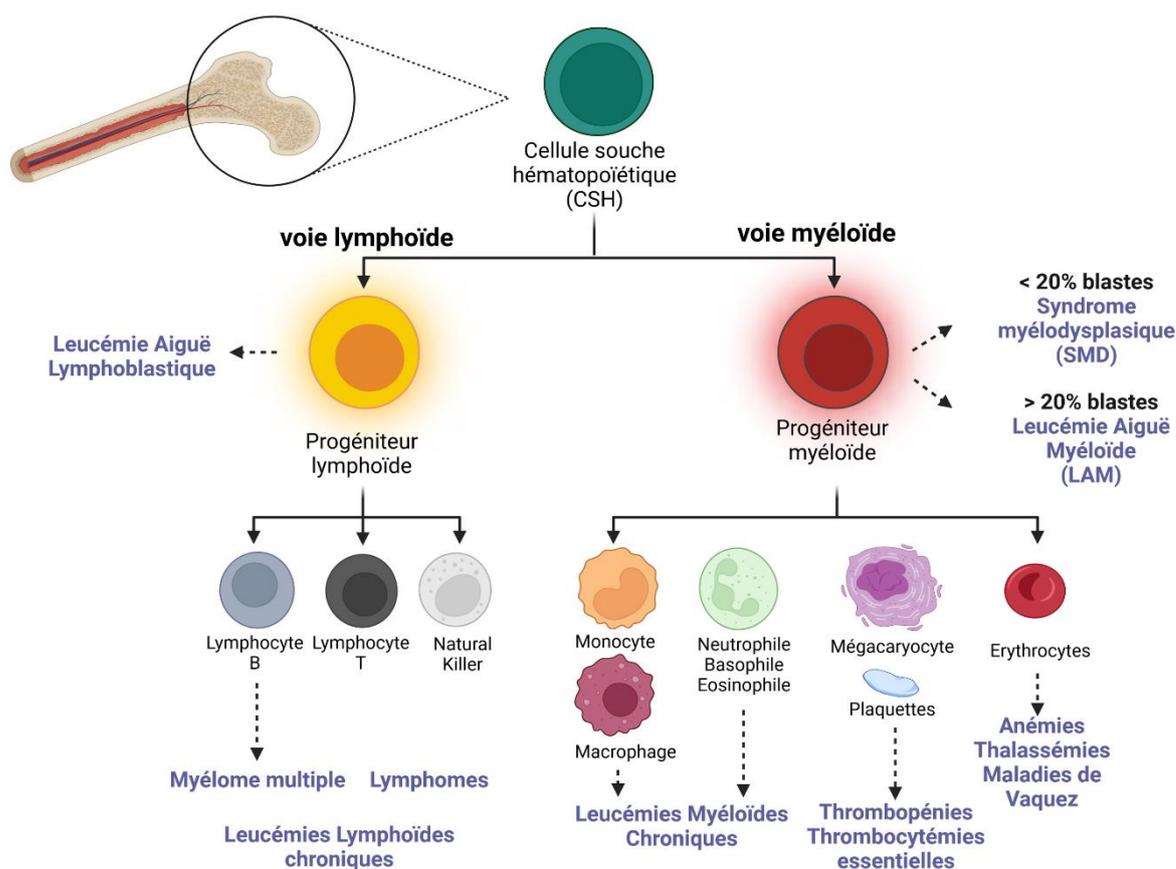


Figure 1: L'hématopoïèse et hémopathies associées - L'hématopoïèse est la différenciation, dans la moelle osseuse, d'une cellule souche hématopoïétique (CSH) en progéniteurs myéloïde ou lymphoïde commun. A ce stade, les progéniteurs lymphoïdes vont pouvoir se différencier en Lymphocyte B, Lymphocyte T ou Natural killer. La dérégulation de la lignée lymphoïde donne lieu à des leucémies lymphoïdes, des myélomes ou des lymphomes. La lignée myéloïde va quant à elle former l'ensemble des cellules myéloïdes. Des défauts dans ces voies conduisent à des hémopathies. Parmi elles, les

syndromes myélodysplasiques (SMD) évoluent souvent en leucémies aiguës myéloïdes. Ils sont considérés comme un stade pré-leucémique.

1.2. Le pronostic et la prise en charge

Les patients atteints de LAM sont pris en charge selon un modèle appelé « 7+3 ». Ce traitement de première ligne utilise de la cytarabine (ou AraC) pendant 7 jours associée à une anthracycline (daunorubicine ; DNR ou Idarubicine ; Ida) sur les 3 premiers jours. Malgré un bon taux de réponse à cette chimiothérapie conventionnelle, 80 % des patients rechutent dans les 5 ans suivant le traitement (Hackl et al., 2017) (**Figure 2B**). Les évolutions thérapeutiques de cette dernière décennie offrent un avantage sur la survie sans incident. Notamment la classification FAB (*French American British*), basée sur le stade de blocage en différenciation des cellules leucémiques, a été complétée par la classification de l'*European Leukemia Net* (ELN) qui ajoute désormais les altérations génétiques dans le facteur de risque pronostique (favorable, défavorable et intermédiaire) (Döhner et al., 2017; Papaemmanuil et al., 2016). Cette évolution a permis une prise en charge personnalisée avec le développement de thérapies ciblées telles que des inhibiteurs des isocitrate déshydrogénases 1 ou 2 mutées (IDHi), des tyrosines kinases FLT3 (gilteritinib) ou encore le développement d'un inhibiteur de Bcl-2 (Venetoclax ou Ven) (Bose et al., 2017; Carter et al., 2020; Kantarjian et al., 2021) (**Figure 2A**). Malgré des taux de rémission prometteurs avec ces nouvelles thérapies, les rechutes restent fréquentes et sont le reflet d'une résistance de certaines cellules aux différents traitements (Bosc et al., 2021; DiNardo et al., 2020; Sharon et al., 2019; Short et al., 2020; Stuardi et al., 2021). Il est alors indispensable de mieux définir les mécanismes qui permettent aux cellules d'échapper à la mort cellulaire afin d'éviter les échecs thérapeutiques.

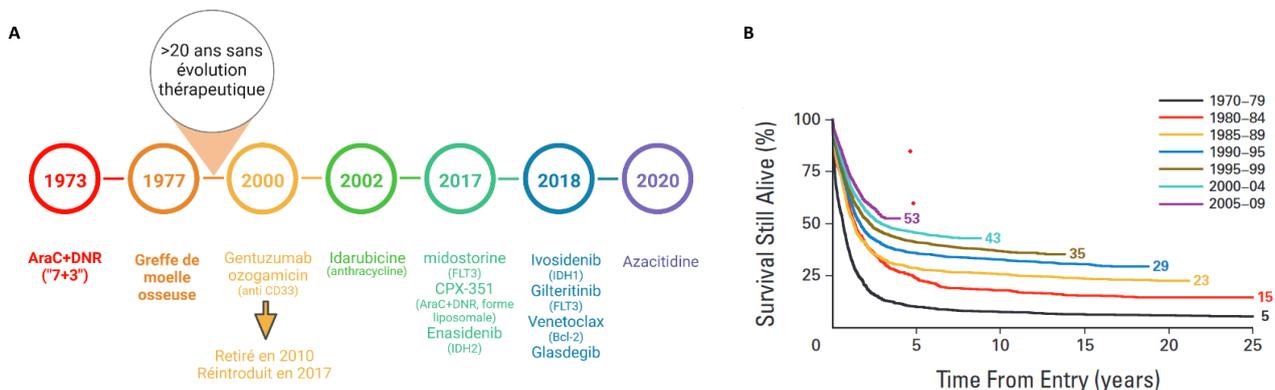


Figure 2 – Amélioration de la prise en charge dans les leucémies aiguës myéloïdes. (A) Evolution des traitements approuvés par la « Food Drug Administration » pour la prise en charge des LAM (adapté d'après Carter et al., 2020). Depuis la mise en place de la chimiothérapie conventionnelle associant l'AraC, avec la DNR selon un modèle appelé « 7+3 » en 1973 il y a eu peu d'évolution thérapeutique jusqu'aux années 2000. En 2002, l'Ida, anthracycline de nouvelle génération remplace la DNR. En 2017, de nombreuses thérapies spécifiques pour les mutations IDH1/2 ou encore FLT3 ont émergé. On retrouve également l'azacitidine, un agent déméthylant, approuvé en 2020 qui a permis en association avec l'AraC d'améliorer la prise en charge des sujets âgés. **(B)** Courbes de Kaplan-Meier dans les LAM (issue de Burnett et al., 2011). L'évolution thérapeutique de la dernière décennie a permis d'améliorer la survie des patients atteints de LAM.

En bref

Les LAM sont des hémopathies présentant un défaut de différenciation dans la voie myéloïde. Celles-ci sont phénotypiquement et génétiquement très hétérogènes. Aujourd'hui encore les traitements dont nous disposons ne permettent pas d'échapper aux rechutes.

II. La mitochondrie carrefour métabolique et rôle dans la résistance des leucémies aiguës myéloïdes

Dans le traitement des cancers, la résistance thérapeutique reste un problème majeur qui conduit à de nombreuses rechutes. De nombreux mécanismes sont aujourd'hui décrits pour participer à ces mécanismes de résistance. Les altérations génétiques, l'activation de pompes d'efflux, la sélection clonale ou encore la modification de l'expression des cibles peuvent permettre aux cellules d'échapper à la mort cellulaire (Holohan et al., 2013).

Le cancer : une maladie métabolique ?

La prolifération accrue des cellules cancéreuses nécessite une production importante d'énergie et de biomasse. Le métabolisme cellulaire définit l'ensemble des transformations chimiques de matière menant à la production d'énergie. Les cellules transforment les nutriments (glucose, acides aminés, acides gras) en énergie et précurseurs carbonés servant de base à la synthèse des composants cellulaires (acides aminés, lipides et nucléotides). Enfin, les voies cataboliques convergent vers la mitochondrie qui convertit les substrats carbonés en énergie *via* la phosphorylation oxydative (OxPHOS). En effet, les réactions d'oxydoréduction médiées par des cofacteurs tels que les couples NAD^+/NADH et $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ assurent, par un couplage à la chaîne de transport des électrons (*Electron Transport Chain*, ETC), la formation d'adénosine triphosphate (ATP) par l'ATP synthase (**Figure 3**). L'ATP est l'unité principale d'énergie des cellules. Par son hydrolyse en adénosine diphosphate (ADP), elle libère un phosphate. Depuis 2011, le métabolisme a été intégré comme une des caractéristiques des cellules tumorales (Hanahan, 2022; Hanahan and Weinberg, 2011).

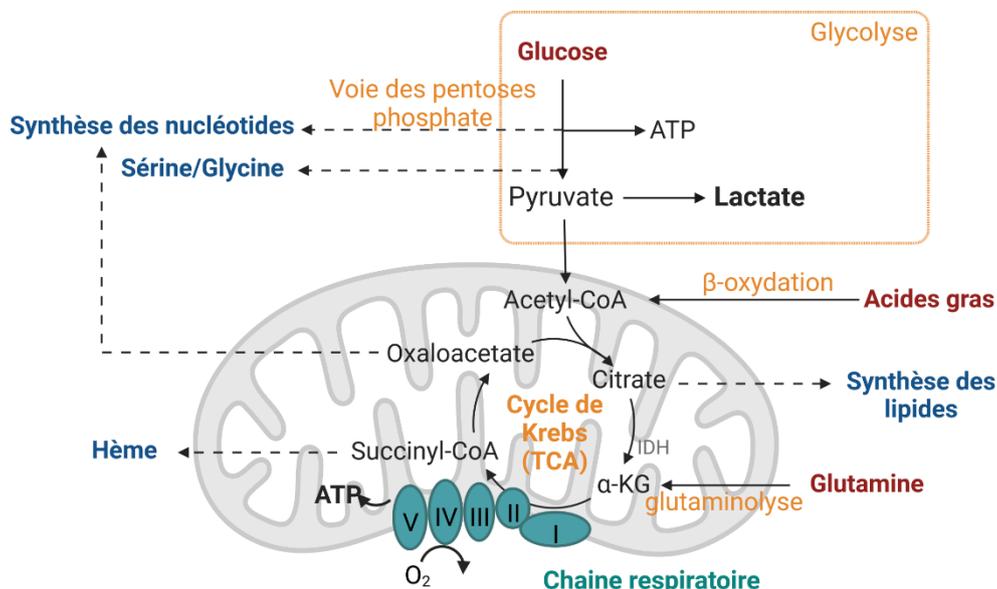


Figure 3- Le métabolisme central. Les différentes voies sont alimentées par les substrats (en rouge) et produisent les précurseurs nécessaires aux différentes voies de biosynthèse (en bleu). La glycolyse oxyde le glucose en pyruvate. Le pyruvate produit est soit alors dérivé en lactate, soit entre dans la mitochondrie où il est transformé en acétyl-CoA pour alimenter le cycle de Krebs (TCA). Ce cycle peut aussi être alimenté par l'entrée de la glutamine (glutaminolyse) ou des acides gras (β -oxydation) et produit les précurseurs pour la synthèse des lipides, des hèmes et des nucléotides. Il génère également les cofacteurs (NADH , FADH_2) nécessaires au fonctionnement de la chaîne respiratoire.

Dans une situation physiologique normale, les cellules oxydent le glucose en pyruvate *via* la glycolyse. Chaque molécule de glucose est ainsi transformée par une série de réactions enzymatiques cytoplasmiques en deux molécules de pyruvate. Au cours de la glycolyse, deux molécules d'ATP sont produites. Cette voie métabolique est reliée à la voie des pentoses phosphates (*pentose phosphate pathway*, PPP) qui participe à la synthèse des nucléotides, à la biosynthèse des lipides ou encore à la voie de synthèse de la sérine/glycine. Les molécules de pyruvate produites sont alors dérivées en lactate par la lactate déshydrogénase ou transportées dans la mitochondrie au sein de laquelle la pyruvate déshydrogénase (PDH) permettra sa conversion en acétyl-CoA. L'acétyl-CoA peut aussi provenir de la β -oxydation des acides gras (β -ox), voie métabolique de dégradation des acides gras. L'acétyl-CoA est alors complètement oxydé par le cycle de Krebs. Lors de son entrée dans le cycle, la citrate synthase condense l'oxaloacétate et l'acétyl-CoA en citrate. Celui-ci est couplé à la chaîne de transport des électrons. L'ensemble des réactions de cette voie produit les cofacteurs nécessaires aux réactions d'oxydoréduction de la chaîne respiratoire (NADH, FADH₂, succinate). Une des enzymes, la succinate déshydrogénase, prend entièrement part au transfert des électrons. Elle est le complexe II de cette chaîne respiratoire (**Figure 3**).

Otto Warburg est le premier à suggérer que le métabolisme des cellules cancéreuses est modifié. Celui-ci montre que, même en présence d'oxygène, les cellules tumorales ont une glycolyse élevée conduisant à une production importante de lactate (DeBerardinis and Chandel, 2020; Weinhouse et al., 1956). Ces premières observations laissaient penser que les cellules cancéreuses ont des mitochondries défectueuses. Depuis, de nombreuses études ont montré que les cellules cancéreuses, en plus d'avoir une consommation en glucose élevée, peuvent réorganiser leur métabolisme en fonction de la disponibilité en nutriments (DeBerardinis and Chandel, 2016; Zhu and Thompson, 2019). L'augmentation de la glutaminolyse et de l'entrée des acides gras pour alimenter la β -oxydation en sont les exemples les plus étudiés (Altman et al., 2016; Carracedo et al., 2013; Martinez-Outschoorn et al., 2017). Cette flexibilité métabolique est étroitement liée aux altérations génétiques des cellules malignes. Par exemple, les mutations sur les enzymes IDH1 et IDH2 observées dans 20% des LAM et des gliomes donnent une nouvelle activité à l'enzyme. L'enzyme mutée consomme l' α -cétoglutarate (α -KG) produit par l'enzyme sauvage pour produire un oncométabolite : le 2-hydroxyglutarate (2-HG). Cette nouvelle réaction consomme également du NADH (Gross et al., 2010). De même, la mutation de p53, de mauvais pronostic dans de nombreux cancers, impacte de nombreuses voies métaboliques dont la voie du mévalonate et la glycolyse (Lacroix et al., 2020; Liu et al., 2019; Vousden and Ryan, 2009). Ces réarrangements métaboliques induisent des modifications épigénétiques.

La mitochondrie

La mitochondrie est considérée comme la « centrale énergétique » des cellules. La production mitochondriale d'ATP est assurée par les oxydations phosphorylantes au niveau de la chaîne de transport des électrons alimentées en NADH et FADH₂ générés par le cycle de Krebs et la β -oxydation (**Figure 4**). Plusieurs acteurs transcriptionnels régulent ces fonctions mitochondriales. Pour exemple, p53, facteur de transcription muté dans de nombreux cancers, est connu pour stimuler l'expression de la protéine d'assemblage du complexe IV : *Synthesis of cytochrome c oxidase 2* (SCO2)

(Matoba et al., 2006). Ce même facteur de transcription active la flavoprotéine *Apoptosis Inducible Factor* (AIF), dont le rôle est le maintien de l'intégrité du complexe I (Stambolsky et al., 2006).

Cet organe possède son propre matériel génétique. Son ADN circulaire transcrit par le facteur de transcription mitochondrial *Mitochondrial transcription factor A* (TFAM) code pour 13 protéines indispensables à sa fonction parmi lesquelles plusieurs sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire (Rackham and Filipovska, 2022) (**Figure 4B**). Des mutations dans cet ADN sont associées à la carcinogénèse (Gorelick et al., 2021). Le facteur de transcription nucléaire *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (PGC1a), permet quant à lui la transcription de plusieurs protéines mitochondriales.

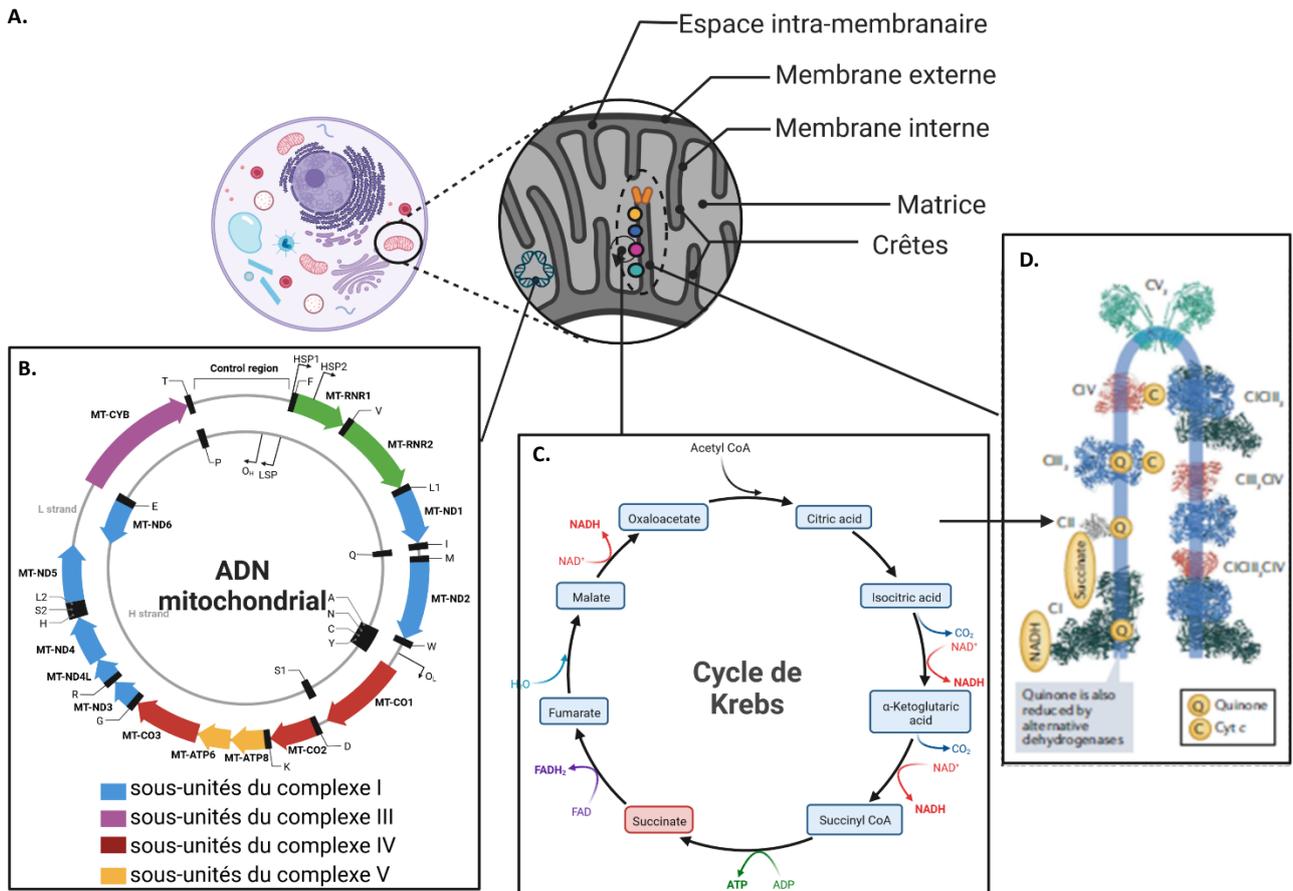


Figure 4 : Fonctions mitochondriales. (A) Structure de la mitochondrie. Les mitochondries sont des organites à double membrane. La matrice contient de (B) l'ADN mitochondrial. Cet ADN circulaire code principalement pour des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire. (C) Le cycle de Krebs est la voie métabolique principale de la mitochondrie. La succinate déshydrogénase (SDH), fait partie intégrante de (D) la chaîne respiratoire. L'organisation des supracomplexes (CICIII₂ ; CIII₂CIV, CICIII₂CIV) régule le potentiel énergétique de la chaîne respiratoire.

2.2.1- La chaîne de transfert des électrons

La chaîne respiratoire prend une part importante dans la production d'énergie. Localisée au sein de la membrane interne des mitochondries, elle réalise les phosphorylations oxydatives (OxPHOS) (**Figure 4A, 4C, 4D**). Cette chaîne, composée de 4 complexes, réalise un transfert d'électrons et utilise les cofacteurs NADH et le succinate issus du cycle de Krebs pour générer un gradient électrochimique de protons au niveau de l'espace intramembranaire de la mitochondrie. L'énergie du gradient de protons ainsi générée est utilisée par l'ATP synthase, qui phosphoryle l'ADP en ATP.

Les complexes de la chaîne respiratoire sont des complexes macromoléculaires constitués de l'assemblage de plusieurs sous-unités protéiques codées par l'ADN génomique et mitochondrial (**Figure 4D**). Ces 4 complexes sont munis de cofacteurs participant aux réactions d'oxydo-réduction comme des motifs fer-souffre (Fe-S) et hèmes (**Figure 5A**).

- Le complexe I (ETC-I) : NADH déshydrogénase oxyde le NADH en NAD⁺ avec réduction de l'ubiquinone (CoQ) en ubiquinol. Ce couplage réactionnel permet le passage de quatre protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intramembranaire. Ce complexe est le plus gros de la chaîne respiratoire et 6 de ses 43 sous-unités sont codées par l'ADN mitochondrial. 8 motifs Fe-S sont présents dans ce complexe.
- Le complexe II (ETC-II) : la succinate déshydrogénase est à l'intersection entre 2 voies métaboliques : l'OxPHOS et le cycle de Krebs. Cette enzyme oxyde le succinate en fumarate. Le FADH₂ produit par cette réaction permet la réduction l'ubiquinone en ubiquinol. Ce complexe est composé de l'assemblage de 4 sous-unités et comprend 3 clusters Fe-S. Il est le seul complexe à ne pas avoir de pompe à protons.
- Le complexe III (ETC-III) : le cytochrome bc₁ oxydoréductase collecte l'énergie des électrons cédés à l'ubiquinol par les deux premiers complexes. L'oxydation de l'ubiquinol en ubiquinone est couplée à la réduction du cytochrome c ferrique (Fe³⁺) en cytochrome c ferreux (Fe²⁺). L'énergie générée permet le transfert de quatre protons dans l'espace intramembranaire. Ce complexe contient la protéine Rieske. Le cluster Fe-S de cette protéine permet le transfert d'électrons entre la quinone et l'hème du cytochrome c.
- Le complexe IV (ETC-IV) : la cytochrome c oxydase catalyse l'oxydation du cytochrome c. L'activité du complexe consomme de l'oxygène. Cette dernière réaction de la chaîne respiratoire permet l'accumulation de deux protons supplémentaires dans l'espace intramembranaire.
- Le complexe V : l'ATP synthase est la dernière réaction. Ce complexe ne prend pas part à la chaîne respiratoire mais utilise la force motrice générée par celle-ci pour produire l'ATP. Deux unités structurelles constituent ce complexe : le sous-complexe F₁ présent dans la matrice mitochondriale qui constitue l'unité fonctionnelle et le sous-complexe F₀ transmembranaire qui permet le transfert des protons de l'espace intramembranaire à la matrice.

L'activité de cette chaîne est associée à 2 transporteurs d'électrons mobiles : l'ubiquinone et le cytochrome c (**Figure 5B**).

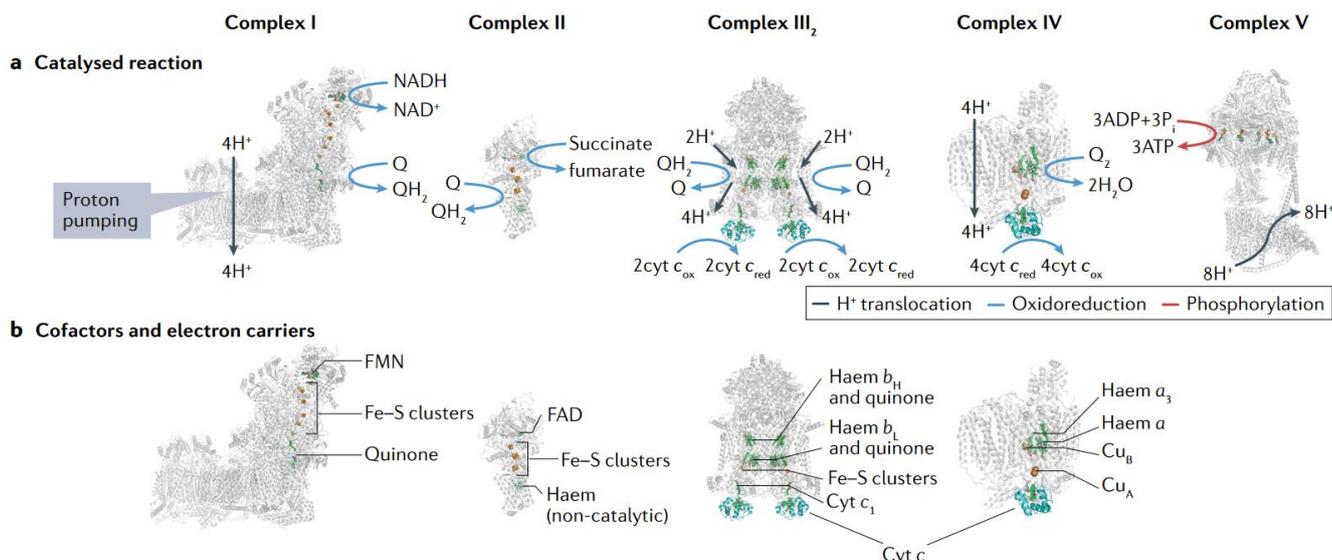


Figure 5: Activité des complexes de la phosphorylation oxydative et cofacteurs (issue de Vercellino and Sazanov, 2022). La chaîne respiratoire située dans la membrane interne de la mitochondrie est constituée de 4 complexes. **(a)** Activités des complexes de la chaîne respiratoire. Les complexes I, III et IV possèdent une activité de pompe à protons facilitée par l'énergie des électrons libérée par leurs activités oxydoréductase. Le complexe II, permet de lier cette chaîne au cycle de Krebs. Le complexe IV quant à lui consomme de l'oxygène. Le complexe V, ne prend pas part au transport d'électrons, permet la production d'ATP en utilisant l'énergie du gradient de protons créé par les autres complexes. **(b)** Cofacteurs et transporteurs d'électrons. Pour soutenir leurs activités, les complexes de la chaîne respiratoire sont munis de cofacteurs riches en fer : Fe-S, hèmes. Le cytochrome c (cyt c) et l'ubiquinone facilitent le transfert des électrons entre les complexes.

2.2.1 – La mitochondrie et la mort cellulaire

La mitochondrie régule aussi les voies de mort cellulaire. Elle est au centre de la mort cellulaire programmée par apoptose (**Figure 6A**). Dans les étapes précoces de l'apoptose, la localisation sub-cellulaire des signaux pro- et anti-apoptotiques est modifiée. Les protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl-xl, sont dissociées de la mitochondrie pour être remplacées par les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak. La présence de Bak et Bax permet l'ouverture du pore de perméabilité membranaire. Ce pore est un complexe protéique dynamique dont la composition exacte reste discutée. VDAC (*dependant voltage anion channel*) et ANT (*Adenosine Nucleotide Translocase*) sont des composants principaux de celui-ci et créent un canal à travers les membranes mitochondriales. La présence de l'enzyme glycolytique hexokinase II (HK2) au pore est également connue pour inhiber son ouverture. Le complexe V de la chaîne respiratoire semble également prendre part à ce complexe. L'ouverture du pore de perméabilité membranaire mitochondrial conduit à une perte du potentiel de membrane mitochondrial et à une libération du calcium mitochondrial et du cytochrome c. Alors que le calcium mitochondrial conduit à la translocation de Drp1 (*Dynamain-1-like protein*), protéine impliquée dans la fission mitochondriale pour induire la fragmentation mitochondriale, le cytochrome c libéré conduit à la formation de l'apoptosome et au clivage des caspases 9, 3 et 7 aboutissant à la fragmentation de l'ADN. L'apoptose extrinsèque médiée par des signaux extracellulaires et la mort cellulaire par pyroptose conduisent au clivage de la caspase 8 qui permet alors une activation de Bid pouvant activer les voies mitochondriales de l'apoptose (Bock and Tait, 2020; Bonora et al., 2015; Chipuk et al., 2006) (**Figure 6B**). Si l'apoptose est non immunogène, la pyroptose induite par l'activation de FAS conduit à la libération de potassium et de cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18.

La mitochondrie trouve également une place particulière dans la régulation d'autres mécanismes de mort cellulaire (Bock and Tait, 2020). Dans la nécroptose, l'activation de la signalisation par le TNF dissocie RIP1 permettant la formation d'un complexe RIPK1/RIPK3 (**Figure 6D**). Phospho-RIPK3 avec l'aide de MKBL, est transloquée à la mitochondrie et active la pyruvate déshydrogénase (PDH) (Yang et al., 2018). Cette enzyme, en permettant la transformation du pyruvate de la glycolyse en acétyl-CoA nécessaire à l'activité du cycle de Krebs, augmente l'activité de la chaîne respiratoire. L'activité de la chaîne respiratoire conduit à une accumulation des espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*, ROS). Les ROS mitochondriaux régulent un autre mécanisme de mort : la ferroptose (**Figure C**). Dans cette voie de mort cellulaire, les ROS cellulaires par la réaction de Fenton sont dérivés en espèce radicalaire (RO•). Ces espèces réagissent avec l'oxygène et un acide gras environnant pour former un lipide peroxydé (Chen et al., 2020; Dixon et al., 2012).

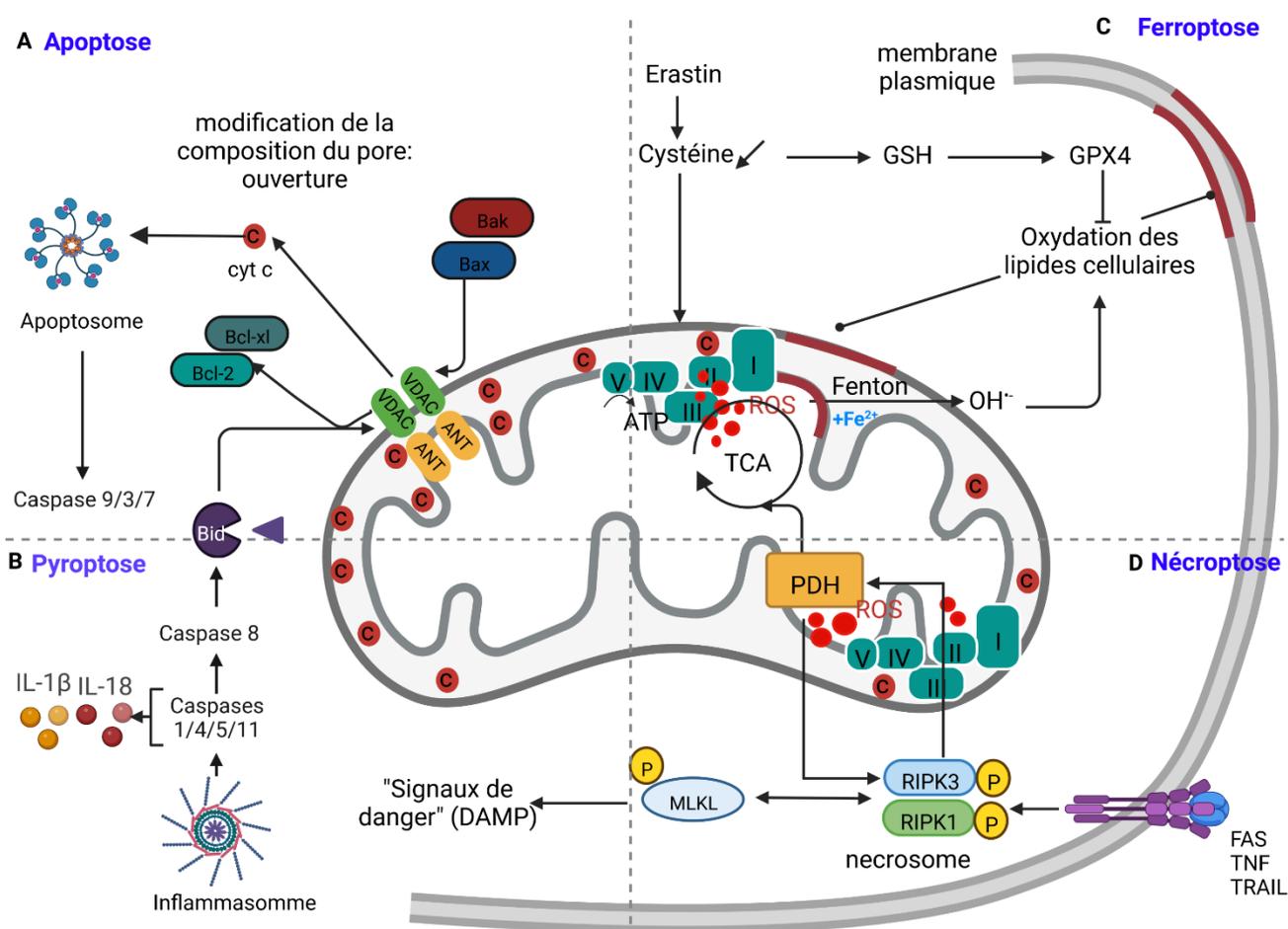


Figure 6: Implication de la mitochondrie dans les mécanismes de mort cellulaire. La mitochondrie régule les voies de mort cellulaire. **(A)** L'apoptose mitochondriale modifie la composition du pore de perméabilité mitochondriale composé de VDAC et ANT. Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x1 se dissocient et Bak et Bax se positionnent à la mitochondrie. Cette modification permet l'ouverture du pore et la perméabilité membranaire. Le cytochrome c (cyt c) libéré prend part à l'apoptosome conduisant au déclenchement de la cascade apoptotique avec le clivage des caspases 9, 3 et 7 aboutissant à la fragmentation cellulaire. **(B)** La pyroptose converge vers cette voie. Le clivage des caspases inflammatoires 1, 4, 5 et 11 permet le clivage de Bid qui pourra permettre la dissociation des protéines anti-apoptotiques et l'ouverture du pore. Le clivage de la caspase 1 permet la production des interleukines IL-1 et IL-18. **(C)** La ferroptose implique la cystéine et le glutathion. La réactivité des ROS mitochondriaux avec le fer (Fe²⁺) produit des radicaux oxygénés qui peroxydent les lipides conduisant à l'altération des membranes et la mort cellulaire. **(D)** La nécroptose, suite à un signal inflammatoire forme le

nécrosome. La phosphorylation de RIPK3 et MLKL permet la translocation de RIPK3 dans la mitochondrie où la protéine active la PDH qui va soutenir le cycle de Krebs (TCA) et par conséquent l'activité de la chaîne respiratoire.

Le métabolisme dans la résistance thérapeutique

Notre équipe a montré en 2017 que les cellules résistantes à l'AraC possèdent un métabolisme oxydatif exacerbé caractérisé par une masse mitochondriale et un potentiel de membrane mitochondrial augmentés, une signature génique liée à la phosphorylation oxydative et un niveau d'espèces réactives à l'oxygène accru (Farge et al., 2017). Dans cette étude, nous montrons que cibler ce métabolisme avec la tigécycline, un agent bloquant la traduction mitochondriale, améliore la sensibilité à l'AraC *in vitro* et *in vivo*. Ces résultats montrent l'importance de la mitochondrie dans la résistance thérapeutique à l'AraC. Pour contourner ces mécanismes de résistance, de nombreuses molécules ciblant le métabolisme énergétique ont été testées (Gallipoli et al., 2018; Maryanovich and Ito, 2022; Stuani et al., 2019) (**Figure 7**). Cependant, l'apparition de résistances à ces molécules montre une grande flexibilité métabolique des cellules tumorales.

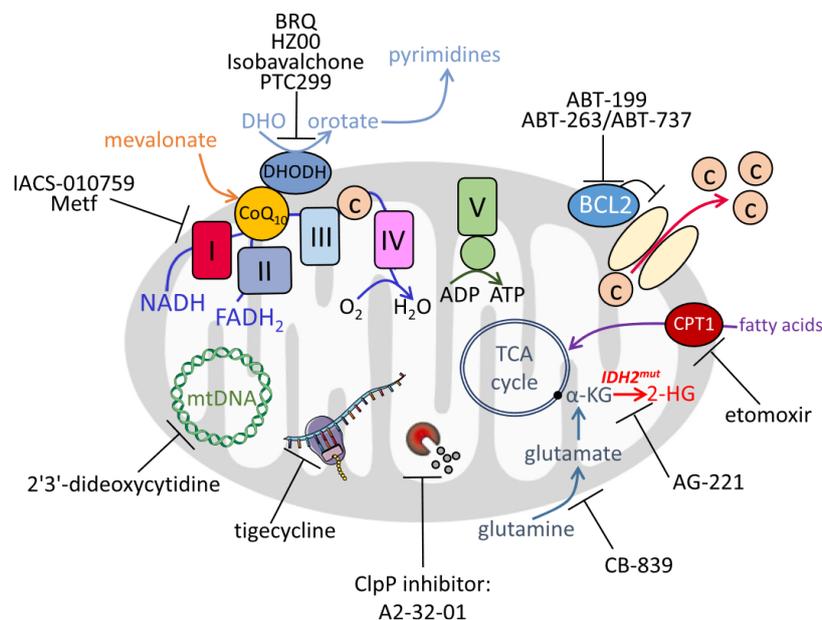


Figure 7: inhibiteurs de l'activité mitochondriale (Stuani et al., 2019). De nombreuses molécules peuvent cibler la mitochondrie et par conséquent l'activité OxPHOS des cellules : des inhibiteurs du complexe I de la chaîne respiratoire (IACS et Metformine), des inhibiteurs de la dihydroorotate déshydrogénase (DHODH), les inhibiteurs de la transcription et traduction mitochondriale, des inhibiteurs de la glutaminolyse (CB-839), des inhibiteurs des protéases mitochondriales (ClpP), des inhibiteurs de l'activité d'IDH2 muté (AG-221), les inhibiteurs de la β-oxydation (etomoxir) et enfin des inhibiteurs de protéine anti-apoptotique Bcl-2 (ABT-199, ABT-263, ABT-737).

Le microenvironnement participe aussi à la régulation du métabolisme des cellules de LAM. Dans la moelle osseuse, alors que les adipocytes fournissent des acides gras pour soutenir la β-oxydation ; les cellules stromales peuvent libérer de la glutamine et de la cystéine qui prennent respectivement part à la glutaminolyse et protègent du stress oxydant (Méndez-Ferrer et al., 2020). L'augmentation de la masse mitochondriale dans les blastes résistants est aussi soutenue par un transfert de mitochondries des cellules stromales vers les cellules leucémiques (Moschoi et al., 2016). Depuis, une meilleure compréhension des mécanismes de résistances aux thérapies ciblant le métabolisme énergétique (OxPHOSi) a permis de montrer que ce mécanisme de transfert mitochondrial

peut également protéger les cellules leucémiques de la mort induite par les OXPHOSi (Saito et al., 2021).

En bref

Les cellules cancéreuses possèdent un métabolisme dérégulé et leur flexibilité métabolique participe aux résistances thérapeutiques. Ainsi, cibler ce métabolisme permet de sensibiliser les cellules aux traitements. Les voies d'oxydation du glucose, des acides gras et des acides aminés convergent vers la mitochondrie pour alimenter le cycle de Krebs qui permet le fonctionnement de la chaîne de transport des électrons. Cette chaîne constitue la principale origine de la respiration. Elle est constituée de 4 complexes contenant des cofacteurs riches en fer qui favorisent le transport des électrons via les réactions d'oxydoréduction ou le transport de l'oxygène. Les réactions d'oxydoréduction participent à la création d'un gradient de protons qui permet in fine la production d'ATP, unité d'énergie des cellules.

III. L'homéostasie du fer

Le fer est un oligoélément indispensable au maintien de l'homéostasie cellulaire. Il est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire, du métabolisme énergétique et du statut redox (Breuer et al., 2008; Zhang, 2014). L'organisme consomme 20 à 25 mg de fer par jour principalement pour le renouvellement constant des érythrocytes indispensables au transport de l'oxygène dans l'organisme. Cette forte demande nécessite une régulation permanente du niveau de fer dans l'organisme. Chaque jour au niveau intestinal, les entérocytes absorbent 1 à 2 mg de fer, le reste du fer provenant de la régulation dans l'organisme du stockage par les entérocytes, de la sécrétion d'hépcidine (Hamp, LEAP1), ou encore par le recyclage du fer contenu dans l'hémoglobine des érythrocytes sénescents. L'hépcidine est l'hormone de contrôle des flux de fer systémiques. D'un point de vue systémique, le fer est principalement présent sous forme soluble couplé à la transferrine (Tf). La Tf possède deux sites d'affinité pour le Fe(III) et représente la source majeure de fer disponible pour les cellules (Hentze et al., 2010).

L'homéostasie du fer cellulaire et mitochondrial

Le fer entre dans la cellule sous forme libre par le transporteur *divalent metal transporter* (DMT1) ou complexé à la Tf par endocytose du récepteur à la Tf (CD71 ou TfRC). Plus récemment, le récepteur à l'acide hyaluronique, CD44, a été décrit comme pouvant participer au transport du fer (Müller et al., 2020). Le pool de fer libre cytosolique (LIP) est alors soit exporté en milieu extracellulaire par la ferroportine (FPN), soit stocké en se complexant à la ferritine (FTL et FTH1), ou utilisé comme senseur des ROS en participant à la réaction de Fenton. Il est aussi importé dans la mitochondrie par les mitoferrines (MFRN1/SLC25A37 et MFRN2/SLC25A28) (**figure 8**). Ce transporteur est stabilisé par ABCB10 (*ATP binding Cassette B10*). Les endosomes peuvent également interagir directement avec les mitochondries pour acheminer le fer sans libération dans le cytosol (Sheftel et al., 2007). Dans la mitochondrie, le fer est utilisé pour la synthèse des centres Fe-S ou de l'hème (Hentze et al., 2010). Il peut également être stocké en se complexant avec la ferritine mitochondriale (FTMT). L'expression de cette ferritine est associée à la fonction OxPHOS dans les anémies sidéroblastiques. En effet, FTMT est fortement exprimée dans les anneaux sidéroblastiques pour détoxifier le fer mitochondrial accumulé par un défaut de biosynthèse des hèmes (Cazzola et al., 2003). De plus, l'expression différentielle de FTMT dans les tissus indique une association de l'expression de cette isoforme de ferritine avec la fonction OxPHOS et la consommation d'oxygène des cellules (Santambrogio et al., 2007).

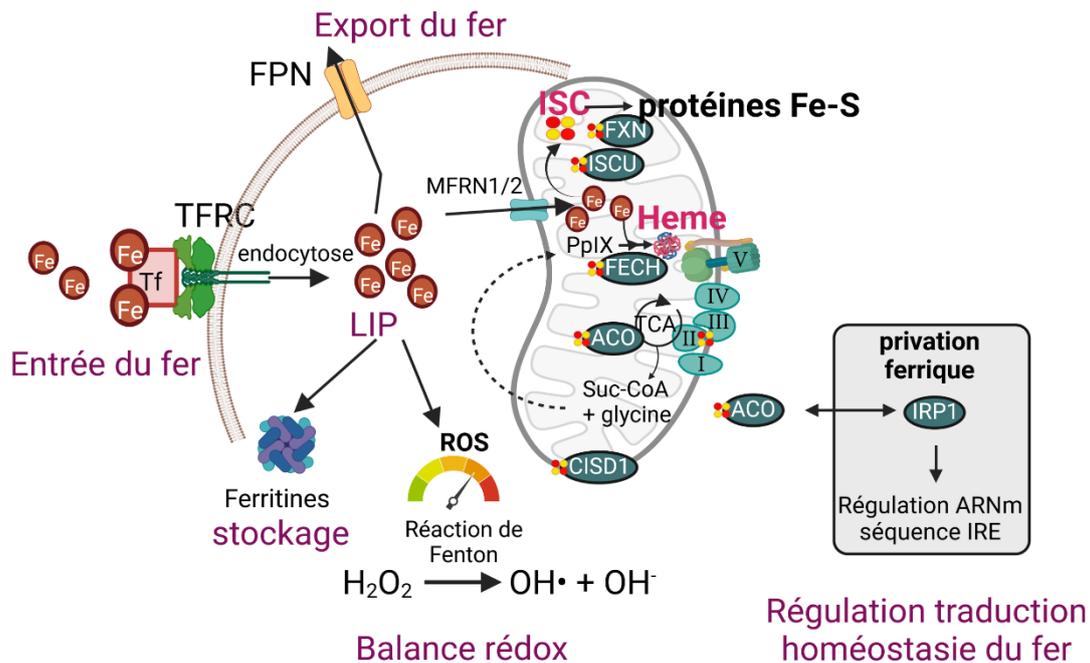


Figure 8: Homéostasie du fer cellulaire. Le fer (Fe) associé à la transferrine (Tf) est endocyté et libéré sous forme labile (Labile Iron Pool, LIP). Ce fer est complexé avec les ferritines pour être stocké, peut être exporté via la ferroportine (FPN), participer à la réaction de Fenton et être transporté dans les mitochondries par les mitoferrines (MFRN1/2). Dans la mitochondrie le fer peut participer à la biosynthèse des motifs Fer-soufre (Iron Sulfur Cluster, ISC) ou être inséré dans les hèmes par l'activité de la Ferrochelatase (FECH). Les Fe-S générés sont alors insérés dans les protéines Fe-S (frataxine, FXN ; ISCU ; FECH ; Aconitase ; ACO ; CISD1). L'insertion du Fe-S dans l'aconitase (ACO) contrôle l'homéostasie du fer.

La synthèse des motifs Fer-Soufre

L'homéostasie du fer est finement régulée par les protéines à centre fer-soufre (Fe-S) (Braymer et al., 2021; Lill and Freibert, 2020; Stehling et al., 2014). La machinerie d'assemblage des complexes Fe-S ou ISC (pour « Iron-sulfur clusters ») est localisée dans la mitochondrie (**Figure 9**). La formation des ISC se réalise en trois étapes : *i.*) Premièrement, un motif [2Fe-2S] est produit et inséré dans la protéine ISCU (Iron-sulfur cluster assembly) avec la participation du complexe NFS1-ISCU formant une protéine ISCU-[2Fe-2S]. Lors de cette étape, la cystéine désulfurase NFS1 forme un complexe avec des protéines ISD11, ISCU et frataxine (FXN) (Lill et al., 2012; Lill and Freibert, 2020). Au sein de ce complexe, la FXN active NFS1 et recrute le fer pour former un centre [2Fe-2S]. Les sous-unités de la chaîne respiratoire ferrédoxine et ferrédoxine réductase ainsi que la FXN permettent le transfert d'électrons et sont des chaperonnes du fer. *ii.* Le centre [2Fe-2S] est libéré par interaction avec des protéines chaperonnes et est transféré au monothiol glutaredoxin GLRX5 et au glutathion (GSH) qui délivre son [2Fe-2S] aux protéines ISCA1, ISCA2 et IBA57 pour la synthèse d'un centre [4Fe-4S]. Ces étapes permettent la formation du facteur X-S (espèces contenant du soufre) indispensable pour l'assemblage cytosolique des Fe-S (Cytosolic iron-sulfur protein assembly, CIA). *iii.* Le centre [4Fe-4S] nouvellement synthétisé est alors inséré aux apoprotéines. Une approche par criblage de type CRISPR a déterminé dans 342 lignées cancéreuses l'importance de protéines Fe-S mitochondriales et cytoplasmiques pour le maintien de la prolifération cellulaire (Ast et al., 2019).

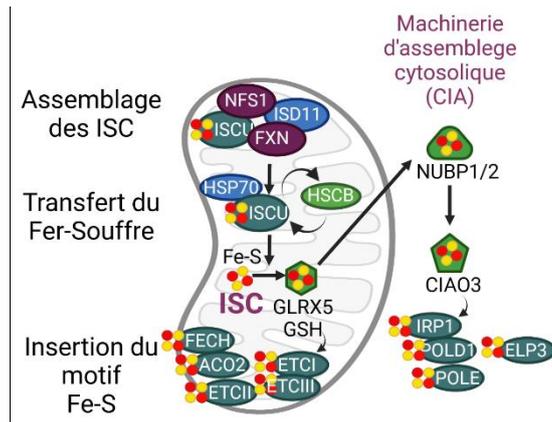


Figure 9: Synthèse des protéines Fe-S. La biogénèse mitochondriale des protéines Fe-S peut se diviser en 3 étapes clés. La première étape est la synthèse *de novo* d'un centre [2Fe-2S] dans la protéine ISCU2. Cette synthèse implique 6 autres protéines dont le complexe cystéine désulfurase NFS1-ISD11-ACP1 donneur de soufre, la FXN donneur de fer et la ferrédoxine réductase (FDXR) ou ferrédoxine FDX2 qui permettent le transfert des électrons. La seconde étape est un système de protéines chaperonnes permettant l'insertion du [2Fe-2S] de ISCU2 au monothiol glutarédoxin GLRX5. La troisième étape est la biogénèse et l'insertion mitochondriale des [4Fe-4S]. Cette étape nécessite le FDX2. Le [4Fe-4S] nouvellement formé est alors délivré aux apoprotéines (entre autres FECH, ACO2, ETC-II, ETC-I, ETC-III). La machinerie CIA permet l'insertion du Fe-S dans les protéines cytoplasmiques et nucléaires (IRP1, POLD1, POLE, ELP3).

Les protéines Fe-S participent à de nombreux processus cellulaires (**Figure 10**). Elles prennent part à la régulation du niveau en fer (IRP1), réplication de l'ADN (POLD1, POLE), au métabolisme énergétique (ACO2, ETCI, SDHB, ETCIII, ETFDH), à la biosynthèse de l'hème (FECH) ou encore à la réparation de l'ADN (DNA2) (Lill and Freibert, 2020). Elles peuvent aussi en cas de stress permettre le fonctionnement d'enzymes du métabolisme en leur cédant leur Fe-S. Ainsi, la FXN peut fournir son Fe-S pour le fonctionnement de la FECH mais aussi pour réparer l'aconitase déficiente (Alvarez et al., 2017; Ast et al., 2019; Yoon and Cowan, 2004).

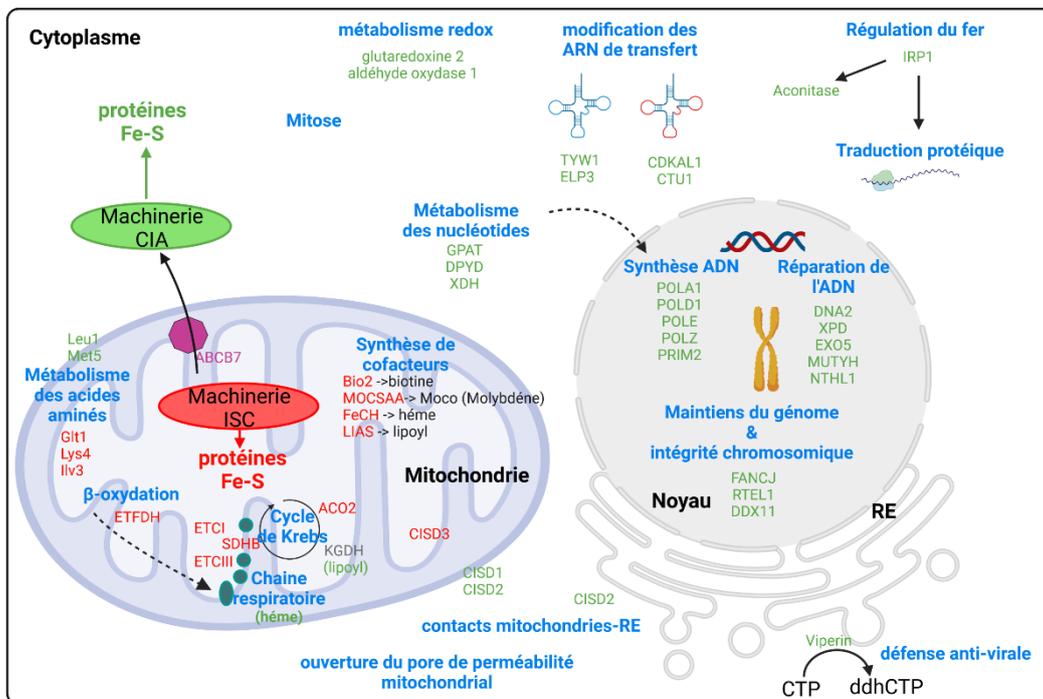


Figure 10: Localisation et fonction des protéines Fe-S (d'après Lill, 2020). Les protéines Fe-S sont assemblées au niveau de la machinerie ISC dans la mitochondrie ou la machinerie d'insertion cytosolique (CIA). Elles

sont impliquées dans plusieurs processus cellulaires parmi lesquels le contrôle de la balance redox, la régulation du fer, la synthèse et réparation de l'ADN, le métabolisme (acides aminés, ETC, β -ox, TCA), les contacts entre réticulum endoplasmique et mitochondrie ainsi que l'ouverture du pore de perméabilité mitochondrial.

Les protéines Fe-S régulent finement l'expression des protéines impliquées dans l'homéostasie du fer (**Figure 11**). Les protéines de réponse au fer (*Iron Responsive Protein*, IRP) contrôlent la traduction des ARN messagers (ARNm) possédant une séquence de réponse au fer (*Iron Responsive Elements*, IRE) (Casey et al., 1988; Hentze et al., 2010). Lors d'une privation ferrique, l'aconitase 1 (ou IRP1), perd son centre Fe-S. Cette modification de conformation modifie l'activité de la protéine. Elle acquiert une activité IRP. Cette protéine module la traduction des ARNm possédant une séquence IRE. Ainsi, IRP1 réprime la traduction des ARNm possédant la séquence IRE en 5' (FTH1, FTL, ALAS, ACO2, FPN, HIF2 α), alors qu'elle stabilise et permet la traduction des ARNm possédant une séquence IRE en 3' (CD71, DMT1) (Aisen et al., 2001; Hentze et al., 2010; Hernández-Gallardo and Missirlis, 2020).

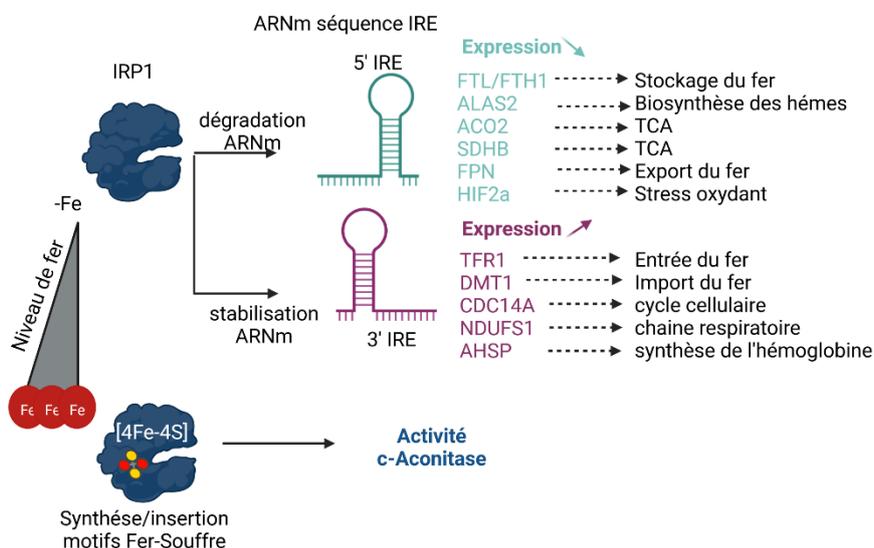


Figure 11: Système de traduction des éléments de réponse au fer. La protéine IRP1 modifie sa structure en fonction du niveau en fer cellulaire. En présence de fer, elle possède un motif Fe-S qui lui confère une activité aconitase cytoplasmique. En l'absence de fer, elle n'a pas de motif Fe-S et régule alors la traduction d'ARNm impliqués dans l'homéostasie du fer possédant une séquence IRE. Elle conduit à la dégradation des ARNm ayant une séquence IRE en 5' (FTH1, FTL ; ALAS2, ACO2, SDHB, FPN, HIF2a) diminuant leur niveau d'expression et stabilise les ARNm possédant une séquence IRE en 3' (TFR1, DMT1, CDC14A, NDUFS1, AHSP).

Récemment l'équipe du professeur Zhang a montré que dans le cancer du foie l'enolase 1 (ENO1), enzyme de la glycolyse, dégrade l'ARNm de IRP1 (Zhang et al., 2022). Cette régulation mène à une diminution de l'expression de Mfrn1 (Zhang et al., 2022). Cette étude a mis en évidence un lien étroit entre la glycolyse et la régulation du fer mitochondrial nécessaire au maintien de l'activité OxPHOS.

La biosynthèse des hèmes

Dans l'organisme, la majorité du fer systémique est sous forme hémique. L'hémoglobine, constituant principal des érythrocytes est composée de 4 groupements hème. Cette structure est un

anneau de protoporphyrine comprenant un atome métallique central, principalement le fer. Cette cage permet la fixation et facilite le transport de l'oxygène.

L'hème est synthétisé à partir d'une série de 7 réactions enzymatiques (**Figure 12**) entre les mitochondries et le cytoplasme. Le cycle peut se diviser en 3 étapes clés :

- 1- **La synthèse de 5-aminolevulinate (ALA)** : L'enzyme ALA-Synthase (ALAS) condense la glycine avec le succinyl-CoA issu du cycle de Krebs pour former de l'ALA. Deux isoformes de cette enzyme mitochondriale existent suivant le contexte cellulaire : ALAS2 est essentiellement présente dans les érythrocytes tandis que dans les autres types cellulaires ALAS1 est exprimée. L'ALA produit est transporté dans le cytoplasme. Le transporteur permettant la transition entre mitochondrie et cytoplasme reste aujourd'hui non défini.
- 2- **Formation des tetrapyrroles** (étapes cytoplasmiques), structures hétérocycliques aromatiques composées de 5 atomes dont un d'azote : au départ, l'ALA déshydratase (ALAD) catalyse la condensation de 2 molécules d'ALA en monopyrrole PBG. 4 molécules de PBG préalablement produites sont assemblées par la PBG-déaminase (PBGD aussi appelée l'hydroxymethylbilane synthase ; HMBS) pour former un tetrapyrrole hydroxymethylbilane linéaire (HMB). L'uroporphyrinogène synthase (UROS), catalyse alors la formation d'uroporphyrinogène III. Lors de l'inhibition ou délétion de UROS, le HMB produit peut être converti en uroporphyrinogène I. Une dernière réaction cytoplasmique catalysée par uroporphyrinogène decarboxylase (UROD) permet de former le coproporphyrinogène III transporté dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie par ABCB6. La coproporphyrinogène-III oxidase (CPOX) décarboxyle celui-ci en protoporphyrin IX (PpIX).
- 3- **Insertion de l'atome de fer** : La ferrochelatase (FECH), une enzyme Fe-S, permet l'insertion finale d'un atome de fer dans la structure permettant la formation de l'hème. L'hème ainsi synthétisé est l'hème b. Celui-ci peut être dérivé en hème a, o ou c. Il est inséré aux hémoprotéines comme les cytochromes et la catalase.

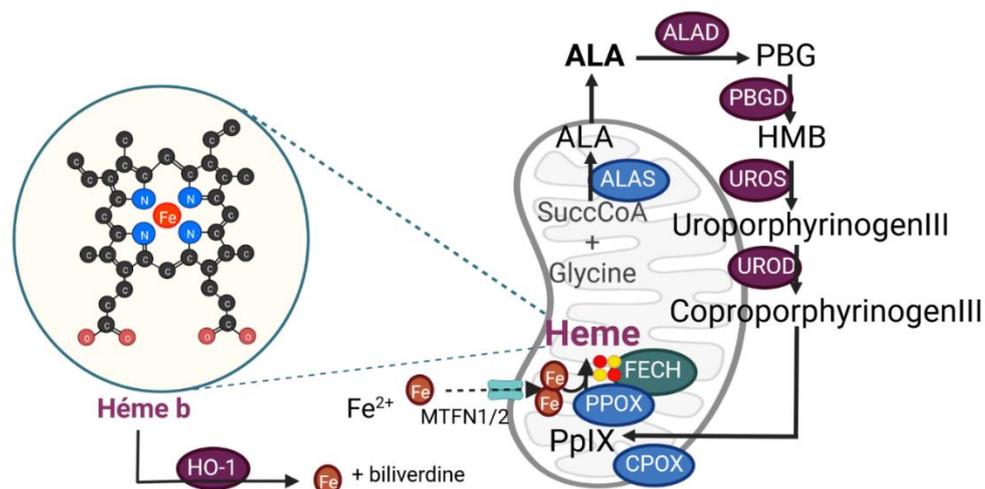


Figure 12: Voie de biosynthèse de l'hème. L'hème est synthétisé à partir de la condensation du succinyl-CoA provenant du TCA et de la glycine en ALA. Une série de réactions enzymatiques, permet ensuite la production de coproporphyrinogène III. Le Coproporphyrinogène III est transporté par ABCB6 dans l'espace intramembranaire où CPOX permet la transformation en PpIX transportée par ABCB10 dans l'espace intramembranaire où la FECH permet l'insertion d'un atome de fer formant l'hème. HO-1 dégrade l'hème en Fer et bilirubine.

L'hème oxygénase 1 (HO-1) est une oxydoréductase permettant la dégradation des hèmes en fer libre (Fe^{2+}) et biliverdine, précurseur de la bilirubine. Cette enzyme est fortement impliquée dans le recyclage du fer des protéines hémiques dégradées et trouve un rôle particulier dans le contrôle du stress oxydant et l'immunité (Campbell et al., 2021).

L'hème peut également être une molécule de signalisation qui, en s'associant à des protéines sensibles à l'hème, va moduler leur fonction. Par exemple, lié au facteurs de transcription BACH1 ou p53, l'hème induit leur dégradation par le protéasome et permet ainsi l'expression des gènes réprimés par ces protéines. Parmi ces protéines on retrouve également ALAS1, IRP2 ou encore la kinase eIF2 α (Pradhan et al., 2020). Dans le cancer du poumon, le métabolisme de l'hème permet d'assurer la production d'ATP *via* l'OxPHOS facilitant la prolifération et la migration des cellules malignes (Sohoni et al., 2019).

Le fer régulateur du stress oxydant

Les activités biologiques au sein de la cellule produisent des ROS. Ces espèces peuvent créer des dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides, pouvant conduire à la mort cellulaire. Pour contrecarrer les effets délétères, la cellule possède des enzymes détoxifiantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) ou encore le glutathion (GSH). Le fer est également un cofacteur majeur de cette détoxification (Bystrom and Rivella, 2015).

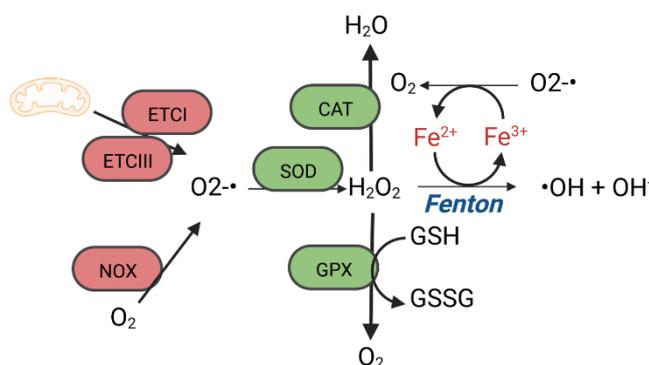


Figure 13 - Régulation des dérivés réactifs de l'oxygène. Les ROS produits par ETC-I, ETC-III et les NAD(P)H oxydases (NOX) sont dérivés en H_2O_2 par la Superoxyde dismutase (SOD). Le H_2O_2 est à son tour transformé en eau par la catalase (CAT), en oxygène par la glutathion peroxydase (GPX) où en radical hydroxyle ($\text{OH}\bullet$) par la réaction de Fenton.

La chaîne respiratoire est le site majeur de la production des ROS. Les complexes I et III, produisent de l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$). La formation d' H_2O_2 et de $\text{O}_2^{\bullet-}$ facilite la transition vers le radical hydroxyle $\text{OH}\bullet$ en présence de fer (Bystrom and Rivella, 2015). L'implication du fer dans cet état de transition s'appelle la réaction de Fenton (**Figure 13**). L' $\text{OH}\bullet$ produit est très toxique et induit de dommages aux biomolécules. En particulier, il conduit à la peroxydation des lipides impliquée dans la mort cellulaire par ferroptose.

De façon intéressante, les ROS modifient la stabilité des facteurs de transcription impliqués dans la réponse à l'hypoxie (*Hypoxia Inducible Factor*, HIF). Les HIFs régulent l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie du fer (EPO, Tf, TfrC, HO-1), la régulation de la disponibilité en oxygène local (VEGF, NOS) et du métabolisme (GLUT1) (de Heer et al., 2020; Hirota, 2019). L'ARNm d'HIF2 α est, quant à lui, régulé par une séquence IRE, dont la traduction dépend du niveau de fer cellulaire (voir paragraphe 3.2).

L'homéostasie du fer marqueur pronostique dans les LAM et régulateur de la différenciation hématopoïétique

Le fer prend une part importante dans la régulation du devenir des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ces cellules s'acclimatent constamment aux stress environnementaux et doivent faire un choix permanent entre l'auto-renouvellement et la différenciation (Caiado et al., 2021). Récemment, un travail a mis en évidence que le butyrate augmente l'érythrophagocytose au sein de la moelle osseuse permettant d'augmenter la concentration locale en fer (Caiado and Manz, 2022). Cette augmentation de la concentration locale en fer favorise la différenciation des cellules souches. Dans cette même étude, ces auteurs ont observé que l'absence des macrophages CD169⁺ diminue l'augmentation en fer et favorise au contraire l'augmentation du pool de CSH (Caiado and Manz, 2022).

Les LAM sont caractérisées par une modification de la disponibilité en fer. La surcharge en fer clinique observée est liée à un défaut d'érythropoïèse observé dans la rate et aux transfusions réalisées pour traiter les anémies fréquentes (Lopes et al., 2021). Plusieurs marqueurs suggèrent que les cellules leucémiques ont un métabolisme du fer dérégulé pouvant participer à la résistance aux traitements (**Figure 14**).

- La ferritine, protéine de stockage du fer est augmentée dans les plasmas de patients atteints de LAM et est associée à un mauvais pronostic. Nous avons montré que les blastes leucémiques sécrètent de la ferritine laissant penser qu'ils pourraient être responsables de cette augmentation (Bertoli et al., 2019; Récher, 2021).
- Le niveau d'expression de la FPN dans les patients atteints de LAM est de mauvais pronostic. Cette protéine responsable de l'export du fer permet de résister à l'AraC. En effet, les auteurs montrent que l'inhibition de FPN par interférence ARN augmente le stress oxydant sensibilisant les cellules à l'AraC *in vitro* (Gasparetto et al., 2019).
- Une expression génique élevée de HO-1 est de mauvais pronostic dans les LAM (Yu et al., 2015). Les transcrits de cette protéine sont augmentés en réponse à l'AraC (Salerno et al., 2017; Zhang et al., 2021). La production des ROS induite par le traitement avec AraC et DNR augmente l'expression d'HO-1. De plus, l'inhibition de cette enzyme par interférence ARN dans les lignées de LAM U937 et THP-1 restaure la sensibilité à l'AraC et DNR (Heasman et al., 2011). Cette enzyme dégrade les hèmes pour recycler le fer et produire de la bilirubine, suggérant que les cellules ont besoin de fer libre pour leur survie.
- Le taux de Tf libre est diminué alors que la Tf saturée est augmentée dans les LAM, suggérant une augmentation du fer dans le plasma. Dans le modèle murin de LAM MLL-AF9, la chimiothérapie intensive avec AraC et doxorubicine augmente le fer dans les sérums des patients. Associé à ce paramètre, une augmentation du taux de fer non lié à la transferrine et de transferrine saturée est également observé (Lopes et al., 2021).
- Les analyses de protéome de milieux extracellulaires de moelle osseuse ont montré que les patients atteints de LAM ont des taux élevés de plusieurs protéines impliquées dans l'homéostasie du fer telles que les ferritines (FTH1, FTL), l'hepcidine et l'érythropoïétine comparés à

des sujets sains (Çelik et al., 2020). Ces résultats peuvent suggérer que l'homéostasie du fer prend une part importante dans la signalisation au sein du microenvironnement.

L'ensemble de ces études se focalisent sur le métabolisme systémique du fer et peu d'entre elles sont portées sur le métabolisme du fer intrinsèque aux cellules leucémiques. L'altération du métabolisme du fer chez les patients atteints de LAM est également fortement liée à un dérèglement de l'expression des médiateurs du métabolisme du fer au niveau des cellules de LAM elles-mêmes. Par exemple, ces cellules surexpriment le récepteur de la transferrine, TFRC, favorisant ainsi l'internalisation des complexes transferrine-fer, ce qui démontre leur contenu en fer élevé (Weber et al., 2021).

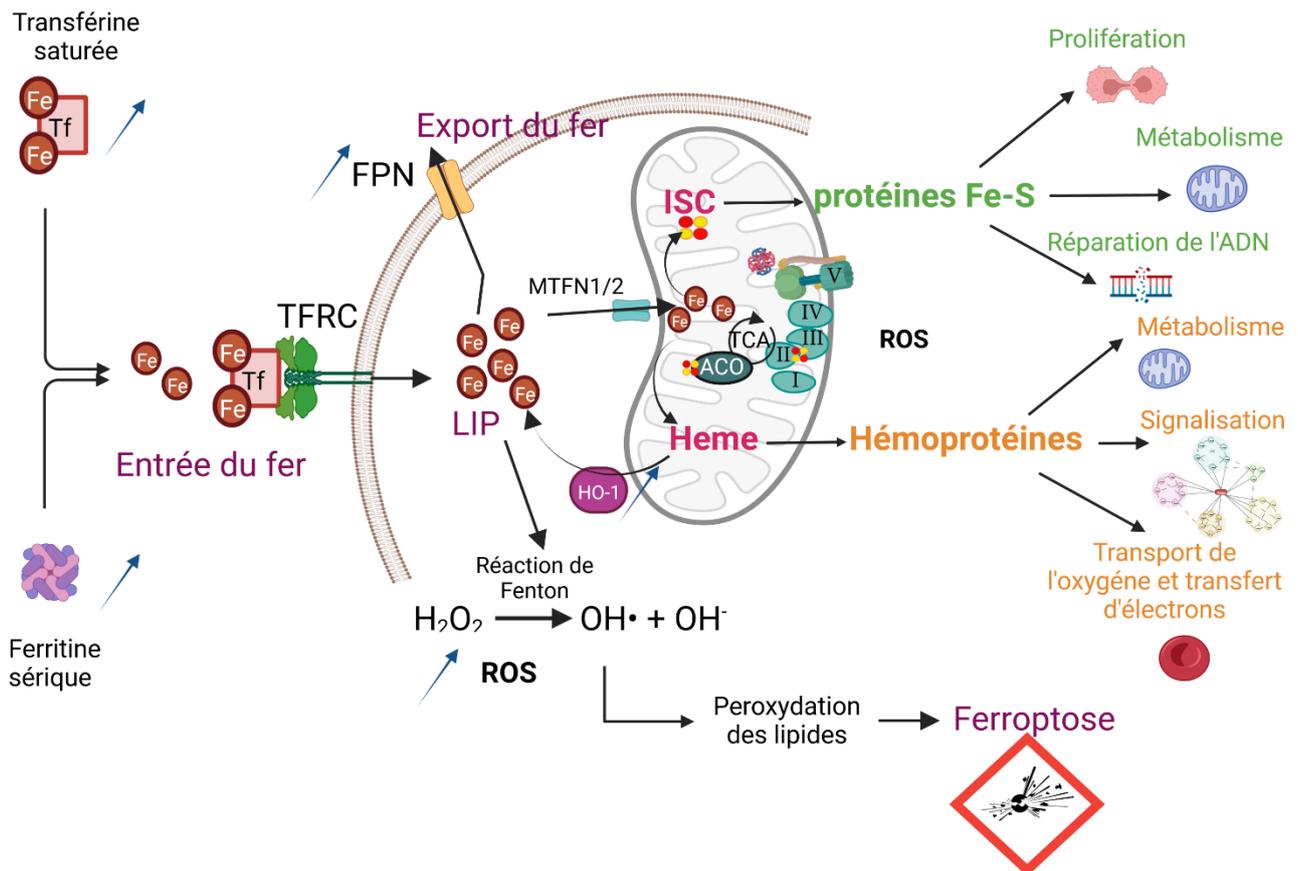


Figure 14: Dérégulation du fer systémique dans les leucémies aiguës myéloïdes: renfort de la résistance thérapeutique? Les patients de LAM présentent des taux élevés de transferrine saturée ou de ferritine. Ces marqueurs sont associés à un mauvais pronostic. En complément, les cellules tumorales produisent des niveaux élevés en ROS et en HO-1. Les hémoprotéines et les protéines Fe-S participant à la prolifération, au métabolisme, à la réparation de l'ADN, à la signalisation cellulaire pourraient être impliquées dans la résistance thérapeutique.

Ces dérégulations du métabolisme du fer semblent être impliquées dans la résistance des cellules. Notamment en participant d'une part à la production des ROS (Torti and Torti, 2013), à la prolifération des cellules mais aussi au maintien du métabolisme oxydatif. Ainsi, limiter la disponibilité en fer par l'utilisation de chélateurs pourrait être une thérapie anti-cancéreuse prometteuse pour éradiquer les cellules résistantes aux thérapies actuelles. Plusieurs chélateurs du fer ont été testés dans les cancers et ont montré des effets anti-tumoraux (Ibrahim and O'Sullivan, 2020). En particulier dans la LAM, ces molécules peuvent induire de la différenciation qui conduit à la mort des cellules (Callens et al., 2010).

Les chélateurs des ions trivalents tels que la deferoxamine (DFO), la deferiprone (DFP) et le deferaxirox (DFX) ont montré des effets dans de nombreux cancers mais leur efficacité reste limitée par leur courte demi-vie et la faible pénétration dans les tissus (Ibrahim and O’Sullivan, 2020). La DFO et le DFP chélatent uniquement les ions trivalents et n’affectent pas le taux d’hémoglobine et les cytochromes (**tableau 1**). Au contraire, le DFX impacte également les ions divalents et induit un stress du réticulum endoplasmique. Une chélation de fer par le DFX inhibe la voie de signalisation mTOR importante pour la croissance et la prolifération cellulaire (Ibrahim and O’Sullivan, 2020).

	deferoxamine (DFO)	deferiprone (DFP)	deferaxirox (DFX)
Masse moléculaire	560	139	373
Perméabilité membranaire	Faible	Moyenne	Elevée
½ vie plasmatique	20 min	1 à 4 h	12 à 16h
Ratio Chélateur : fer	1:1	3:1	2:1

Tableau 1- Caractéristiques des chélateurs du fer possédant une autorisation de mise sur le marché (d’après Hider and Hoffbrand, 2018). Les différents chélateurs du fer utilisés en clinique pour traiter les surcharges martiales. La perméabilité membranaire de ces 3 molécules est différente limitant leur entrée dans les cellules. La ½ vie de ces molécules est également limitée.

Dans le traitement des syndromes myélodysplasiques et de la LAM, Eltrombopag (ELT) est utilisé pour traiter les thrombopénies (déficit plaquettaire). Depuis cet antagoniste du récepteur à la thrombopoïétine (TPO) a montré une action anti-leucémique *via* ses propriétés de chélation du fer (Argenziano et al., 2021; Di Paola et al., 2022; Roth et al., 2012).

En bref

Le fer systémique est régulé par l’hormone hepcidine. Il entre dans les cellules, couplé à la transferrine par l’intermédiaire du récepteur CD71. Le fer intracellulaire participe à la régulation du stress oxydant en participant à la réaction de Fenton qui produit des radicaux hydroxyles et favorise l’initiation de la ferroptose. Ce fer peut aussi être transporté dans les mitochondries où il est utilisé pour la synthèse des hèmes et des Fe-S. Le fer cellulaire est contrôlé par la protéine de réponse au fer (IRP1) qui régule l’expression protéique des acteurs de l’homéostasie du fer en fonction de l’insertion d’un Fe-S. En présence de fer, l’insertion du Fe-S lui donne une activité aconitase. Des dérégulations du métabolisme du fer semblent être impliquées dans la résistance des cellules aux traitements anti-cancéreux. Plusieurs protéines de l’homéostasie du fer ont un impact de mauvais pronostic dans les LAM. Eltrombopag (ELT) a montré une activité anti-leucémique par sa chélation du fer qui induit l’expression de CD71 et une diminution des ferritines et des ROS. De nos jours, l’homéostasie du fer mitochondrial et sa participation aux mécanismes de résistance dans les LAM n’est pas étudiée.

IV. Les macrophages, senseurs du fer et régulateurs de la résistance thérapeutique

Les macrophages

Les macrophages sont des cellules de l'immunité innée, gardiennes de l'homéostasie et de l'intégrité tissulaire (Wynn et al., 2013). Présents dans tous les tissus, ils sont dérivés des monocytes circulants originaires de la moelle osseuse. Des précurseurs embryonnaires résidents des tissus peuvent également être à l'origine de ces cellules (Ginhoux and Jung, 2014; Wynn et al., 2013) (**Figure 15A**). Ces cellules reconnaissent des motifs particuliers aussi appelés « signaux de danger » : DAMPs (*damage associated molecular patterns*) et PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*). Cette reconnaissance permet d'induire une réponse inflammatoire activant la phagocytose et l'élimination de l'agent pathogène ou des cellules « anormales ».

Les macrophages ont une grande plasticité fonctionnelle (**Figure 15**). Les signaux environnants modulent leur fonction pour induire une réponse pro- ou anti-inflammatoire (**Figure 15B**). Dans leur activation dite « classique », associée aux phases précoces d'inflammation, les macrophages ont un rôle pro-inflammatoire. On parle alors de polarisation en macrophages M1. Dans cette phase pro-inflammatoire, ils sécrètent des cytokines et des chémokines permettant le recrutement de cellules pouvant résoudre l'inflammation (IL-6, IL-12 et $TNF\alpha$) et de recruter des cellules T CD4+ et T CD8+ (CXCL9 et CXCL10). Dans un second temps, les macrophages vont la limiter et pour cela induire des signaux anti-inflammatoires (IL-10, $TGF\beta$, CCL17, CCL22, CCL24 et CXCL13) et réparer le tissu. L'effet pro-inflammatoire du TNF est inhibé par IL-10. Les macrophages prennent également part à la résolution de l'inflammation et la réparation tissulaire. Il se dit alors que les macrophages ont une activation alternative. Ces macrophages sont qualifiés de phénotype M2.

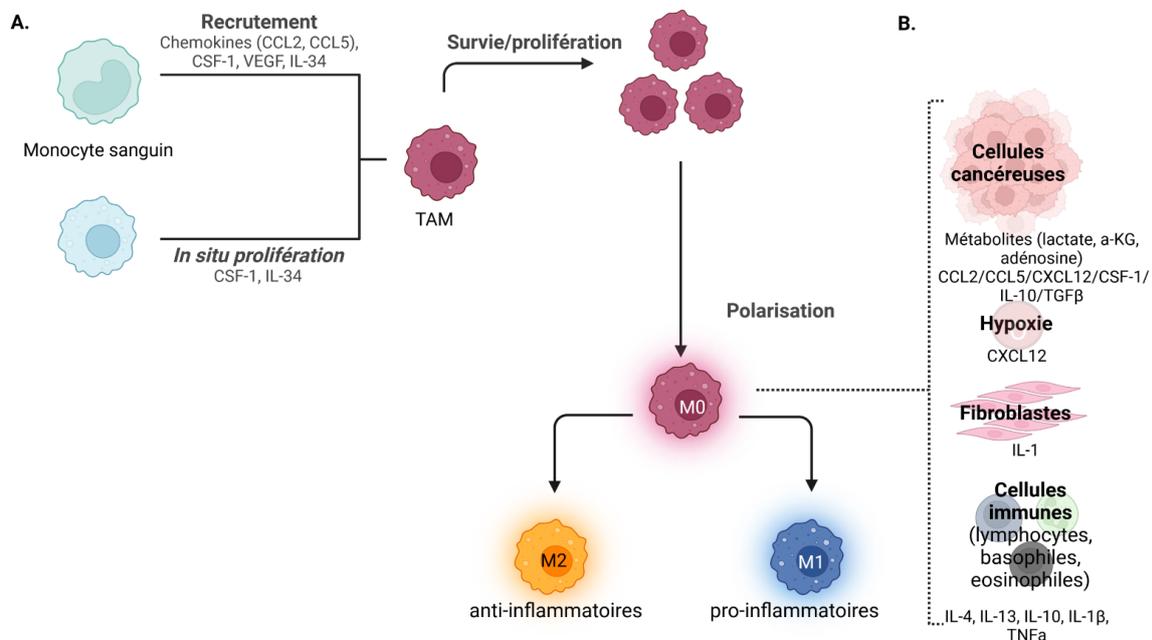


Figure 15: Voies d'activation et de polarisation des macrophages. (A) Des signaux de chemokines permettent la prolifération des macrophages résidents ou le recrutement des macrophages issus de la circulation sanguine au sein de la tumeur. (B) Le microenvironnement (cellules cancéreuses, hypoxie, fibroblastes, cellules immunitaires) module l'expression de signaux qui vont favoriser la polarisation des macrophages en phénotype M1 ou M2.

Cette différence de réponse implique une reprogrammation transcriptionnelle et métabolique (**Tableau 2**). Le statut énergétique de ces cellules immunitaires impacte leur régulation inflammatoire (Biswas, 2015). Les macrophages de phénotype dit M1 caractérisés comme pro-inflammatoires sont glycolytiques alors que les macrophages M2 qui sont anti-inflammatoires utilisent préférentiellement la β -ox, la voie des pentoses phosphates (PPP) et le cycle de Krebs (Mehla and Singh, 2019; Mills et al., 2016). De plus, le succinate et l' α -KG, deux métabolites du cycle de Krebs, ont un rôle déterminant dans cette polarisation. En stabilisant HIF1 α , ils permettent une augmentation des ROS qui favorisent l'inflammation. Il a été montré que les autres cellules immunitaires possèdent également cette flexibilité métabolique pour orienter leur activité pro- ou anti-inflammatoire (Mehta et al., 2017). Cette redirection régule également l'homéostasie métabolique au sein du tissu. Pour exemple, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF α , IL-6 ou IL-1 β induisent une insulino-résistance périphérique pour diminuer le stockage des nutriments et permettre l'utilisation préférentielle de la glycolyse par les cellules immunitaires. Ces cellules favorisent la glycolyse pour leur réponse inflammatoire (Chawla et al., 2011; Odegaard and Chawla, 2013).

	Macrophages M1	Macrophages M2
Signaux activateurs	TNF α , IL-1 β , IL-6, LPS, IFN γ	LPS, IL-4, IL-10, DAMP, IL-13, acides gras
Marqueurs de surface	MCH-II, CD80, CD86, iNOS, TLR-4, TLR-2	CD163, CD206, CD209, FIZZ1 Ym1/2
Facteurs transcriptionnels	NF κ b, STAT1, STAT5, IRF3, IRF5, HIF1 α	STAT3, STAT5, PPAR δ , PPAR γ , cMyc, cMaf,
Cytokines sécrétées	TGF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL16, CCL5	IL-10, TGF- β , CCL1, CCL17, CCL18, CCL22, CCL24, CXCL13, VEGF
Métabolisme	glycolytique	Oxydatif (cycle de Krebs et β -ox)

Tableau 2: Activation et diversité phénotypique, transcriptionnelle, métabolique et sécrétoire des macrophages humains suivant leur polarisation. La polarisation des macrophages est influencée par les signaux du microenvironnement (signaux activateurs). La polarisation modifie l'expression des marqueurs de surface, la signalisation cellulaire ainsi que la sécrétion de cytokines.

Historiquement, les macrophages sont qualifiés de M1 lorsque la réponse est pro-inflammatoire et M2 quand elle est orientée vers un profil anti-inflammatoire. Cependant, depuis l'arrivée de techniques plus résolutes, comme les analyses en cellule unique ou la cytométrie spectrale, celles-ci ont montré une grande diversité phénotypique et fonctionnelle dans la classification de ces cellules. Ainsi, les macrophages M2 ont été dissociés en 4 catégories : M2a, M2b, M2c, M2d (Ginhoux and Jung, 2014). Dans de nombreuses pathologies, ces signaux sont affectés modifiant l'équilibre dans la polarisation des macrophages. Ces cellules tiennent donc un rôle particulier dans les maladies métaboliques telles que le diabète, l'obésité ou encore le cancer.

Les macrophages associés aux tumeurs

Les cellules immunitaires jouent un rôle important dans la carcinogénèse et la réponse aux traitements. Dans le contexte tumoral, les cellules libèrent des cytokines et des métabolites qui modulent la fonction immunitaire (Biswas, 2015). L'immunité est modulée pour permettre une tolérance et un échappement immunitaire dans l'intérêt de la survie et de la progression tumorale. Les macrophages sont souvent augmentés au sein des tumeurs et associés à un mauvais pronostic en favorisant la croissance tumorale, les métastases et l'angiogénèse (Ding et al., 2015; Mantovani et al.,

2017; Reusser et al., 2014; Soki et al., 2015). Plusieurs études ont montré qu'une déplétion des macrophages avec du chlodronate de sodium améliore la réponse aux chimiothérapies suggérant que ces macrophages sont associés à la résistance thérapeutique. Les macrophages modulent le microenvironnement par la sécrétion de facteurs capables de moduler le microenvironnement pour favoriser la croissance tumorale. Ils favorisent la survie et la prolifération (EGF, IL-6, TNF), la réorganisation de la matrice extracellulaire (métalloprotéinases et cathepsines), participent à l'invasion et aux métastases, libèrent des facteurs pro-angiogéniques (VEGFA, IL-8) et produisent des facteurs immunosuppresseurs (Arginase-1, IL-10, PDL1, TGF β) (Engblom et al., 2016). Les macrophages de phénotype M1 sont anti-tumoraux tandis que les macrophages de phénotype M2 soutiennent la prolifération tumorale et les métastases (**Figure 16**).

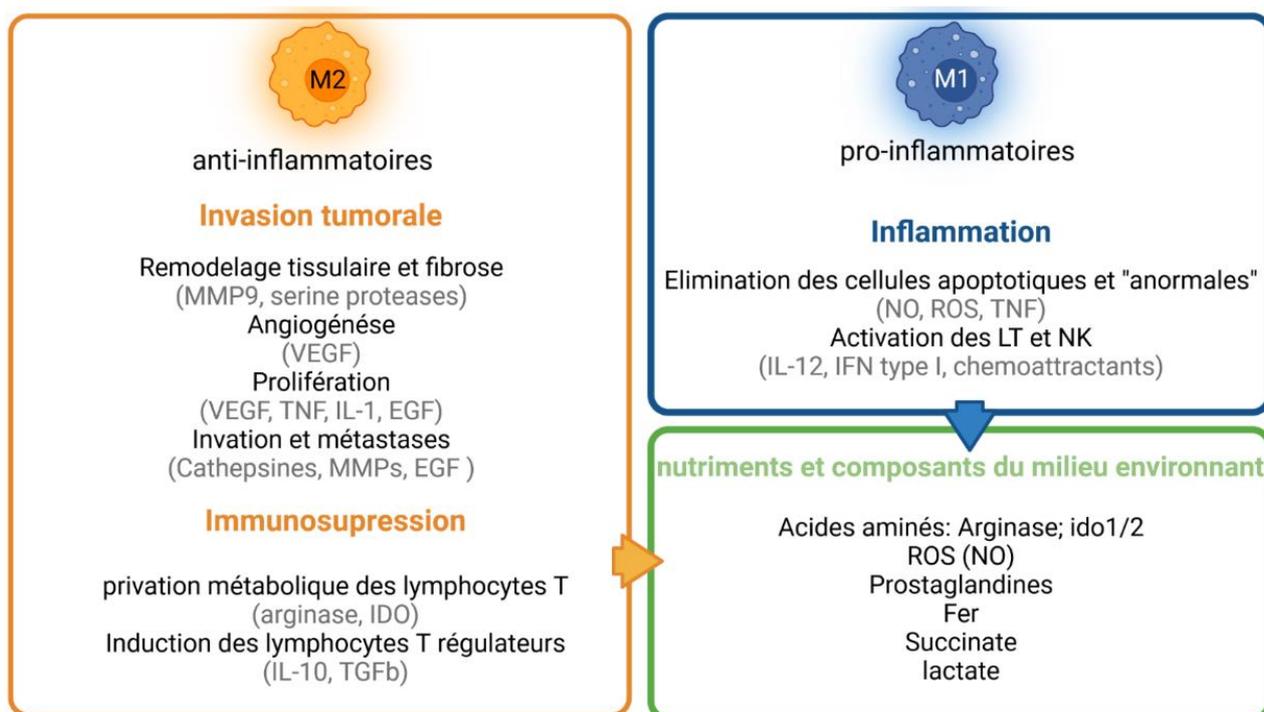


Figure 16; Impact de la polarisation des macrophages sur le microenvironnement. Les macrophages de phénotype M2 ont une fonction anti-inflammatoire. Ils sécrètent des signaux qui favorisent l'invasion tumorale et l'échappement immunitaire. Les macrophages de phénotype M1 promeuvent l'inflammation. La polarisation des macrophages impacte en conséquence les facteurs du microenvironnement.

Dans les hémopathies, des modifications de la fonction immunitaire et des macrophages ont été mises en évidence. Les cellules leucémiques, par exemple, modifient le microenvironnement de la moelle osseuse et influencent la fonction immunitaire des cellules.

Les cellules malignes impactent l'activité cytotoxique des lymphocytes par l'expression de molécules d'inhibition des lymphocytes T CD8+ (PD-L1 et TIM3) et la production de ROS qui sont toxiques pour les lymphocytes T CD8+ et des cellules Natural Killer. De plus, les cellules leucémiques, induisent également une augmentation du nombre des lymphocytes T régulateurs. Elles libèrent de l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO), enzyme responsable de la dégradation du tryptophane qui inhibe la prolifération des lymphocytes T (LT) effecteurs tout en favorisant celle des LT régulateurs (Ragaini et al., 2021). Le niveau d'expression d'IDO impacte la survie des patients. En effet, dans des transcriptomes de cellules leucémiques issus de patients, l'expression d'IDO chez les patients LAM affecte

la survie. Elle est comprise entre 31 et 39 mois pour les patients positifs pour IDO et supérieure à 60 mois pour les patients négatifs (Ragani et al., 2021; Wells et al., 2021).

La LAM affecte la polarisation des macrophages. Dans la moelle osseuse de patients sains, les macrophages sont de phénotype non polarisé M0 alors que dans les LAM, ils sont principalement de phénotype M2. L'expression du CD206, marqueur des macrophages M2, est associée à un mauvais pronostic (Xu et al., 2020). En effet, les cellules leucémiques expriment des enzymes et récepteurs qui influencent la polarisation des macrophages. Par exemple, les blastes produisent de l'Arginase II (Arg2). Cette enzyme dégrade l'Arginine en ornithine et urée. Cette activité, en plus d'affecter la prolifération des lymphocytes T, inhibe la différenciation myéloïde et conduit vers une polarisation anti-inflammatoire de type M2 (Mussai et al., 2013). De plus, la surexpression de l'ectonucléotidase CD39 dans les cellules de LAM résistantes à l'AraC suggère un rôle de la polarisation des macrophages dans la résistance thérapeutique des cellules de LAM (Aroua et al., 2020). Cette enzyme, en catalysant l'hydrolyse de l'ATP extracellulaire en adénosine, favorise une polarisation de macrophages de type M2 (Mehla et Singh, 2020).

Ces observations montrent que les cellules leucémiques modulent le microenvironnement permettant la tolérance immunitaire. Dans la moelle osseuse, les macrophages régulent la circulation des cellules souches hématopoïétiques (Lavin et al., 2015). Nous pourrions alors penser qu'ils pourraient également participer à la circulation des cellules souches leucémiques et à l'établissement de la maladie extramédullaire.

Les macrophages et la régulation du fer

Les macrophages éliminent les érythrocytes sénescents. Les macrophages de la rate et du foie recyclent 20 à 25 mg de fer par jour (Hentze et al., 2010, Mehla and Singh, 2019; Soares and Hamza, 2016). A travers ce recyclage, ils régulent la disponibilité en fer dans le microenvironnement (**Figure 17A**). De plus, confortant l'idée que l'activité mitochondriale mène à un rôle pro-tumoral des macrophages, une carence en fer modifie la polarisation de ces macrophages réduisant l'inflammation (Pereira et al., 2019). L'HO-1, exprimée par les macrophages, dégrade les 4 hèmes de l'hémoglobine, unité structurale des érythrocytes. Le fer libéré peut alors soit être stocké dans le cytoplasme en se complexant à la ferritine, soit être relargué dans le milieu extracellulaire par la FPN. Par cette fonction, ils contrôlent la disponibilité en fer au sein du microenvironnement. Les macrophages M1 sont riches en ferritine et stockent le fer tandis que les macrophages M2 expriment fortement la FPN permettant une libération du fer dans le microenvironnement (Pradhan et al., 2020; Soares and Hamza, 2016) (**Figure 17B**). Ils peuvent libérer du fer pour la production des érythrocytes dans des structures appelées « ilots-érythroblastiques » (Leimberg et al., 2008). De plus, la sécrétion de lipocalin-2, par les macrophages permet une augmentation de la concentration en fer cellulaire dans les tumeurs (Chen et al., 2019).

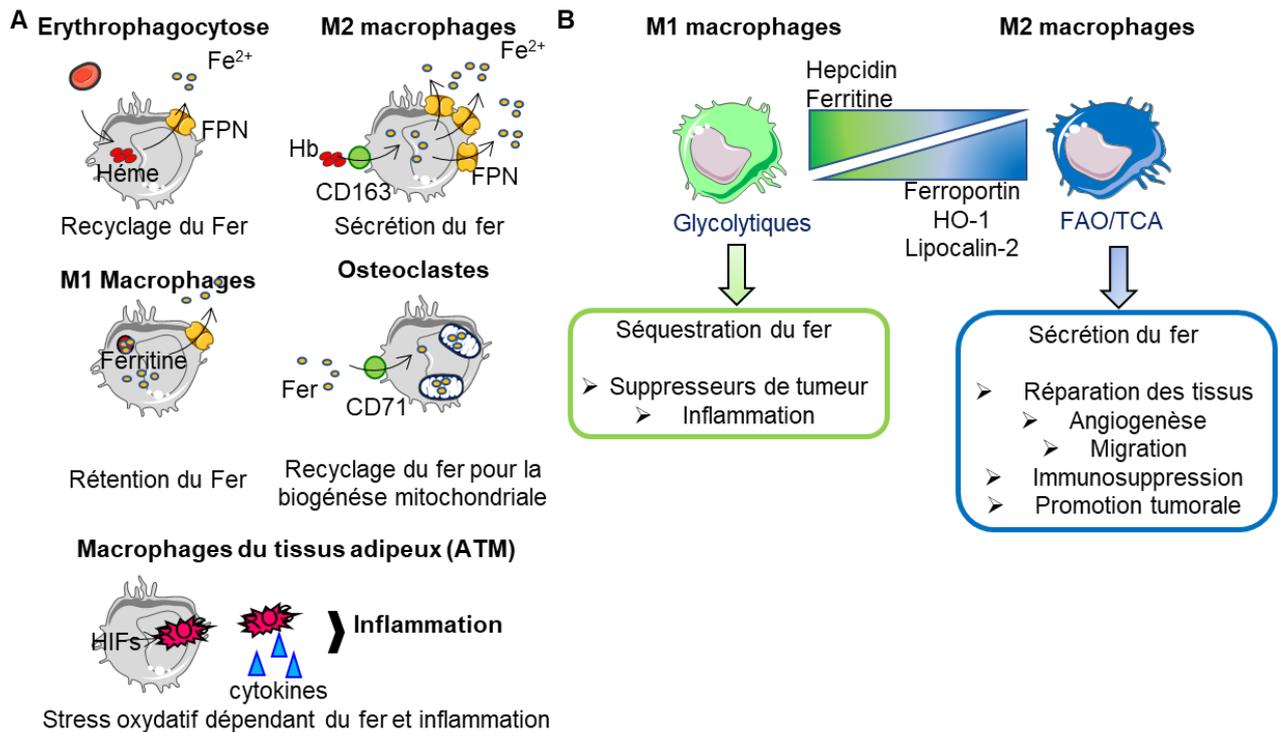


Figure 17: Les macrophages régulent le fer du microenvironnement. (A) (d'après Gammella et al., 2014). Les macrophages recyclent le fer soit par érythrophagocytose des érythrocytes sénescents ou captation du fer libre ou hémique avec leurs récepteurs CD91 et CD163. Les macrophages de type M1 stockent ce fer régulant sa concentration extracellulaire tandis que les macrophages de phénotype M2 relarguent le fer pour le rendre disponible aux cellules environnantes. Dans le contexte des ostéoclastes, le fer du microenvironnement est utilisé pour la biogénèse mitochondriale. Au sein du tissu adipeux le fer régule l'inflammation. (B) Dans le cancer, les macrophages M1 et M2 ont un rôle bivalent. Les premiers ont un métabolisme glycolytique et sont suppresseurs de tumeurs tandis que les seconds ont un métabolisme OxPHOS et participent à la promotion tumorale et migratoire des cellules.

En bref

Les entérocytes permettent l'absorption de 1 à 2 mg de fer par jour. Or la biogénèse des érythrocytes (globules rouges) nécessite 20 à 25 mg de fer par jour. Les macrophages permettent le recyclage du fer provenant des hèmes des érythrocytes sénescents. Ces cellules de l'immunité innée, ont un rôle bivalent. D'un côté, elles vont induire une réponse inflammatoire tandis que d'un autre elles vont résoudre l'inflammation et réparer les tissus lésés. La différenciation fonctionnelle se fait par leur polarisation qui diffère par leur métabolisme. Ces cellules contrôlent la disponibilité en fer du microenvironnement. Ainsi les macrophages pro-inflammatoires de phénotype M1 séquestrent le fer tandis que les macrophages anti-inflammatoires de phénotype M2 rendent le fer disponible pour l'érythropoïèse. Les macrophages de phénotype M2 participent à l'immunosuppression des tumeurs et sont de mauvais pronostic.

Hypothèse et objectifs

Les résistances thérapeutiques représentent aujourd'hui un enjeu majeur dans l'amélioration de la prise en charge des patients atteints de LAM. L'amélioration des techniques de séquençage a permis une meilleure classification mais aussi l'émergence de thérapies ciblées dans les LAM. Malgré des débuts prometteurs de ces nouveaux traitements, nous faisons toujours face à l'apparition de résistances à ces nouvelles molécules. Il est donc nécessaire de mieux définir les mécanismes moléculaires responsables de la persistance des cellules aux traitements. Nous avons précédemment montré que le métabolisme énergétique joue un rôle clé dans la résistance des cellules de LAM. En effet, les cellules initiatrices des rechutes, possèdent un métabolisme O_xPHOS avec une production de ROS exacerbée et cibler ce métabolisme oxydatif augmente la sensibilité des cellules aux différents traitements. Cependant, les mécanismes mitochondriaux, en particulier le rôle des cofacteurs participant aux réactions de la fonction O_xPHOS des cellules résistantes restent à ce jour inconnus.

Le fer est un cofacteur indispensable à l'activité mitochondriale. L'homéostasie de cet ion au sein des tissus est largement contrôlée par le microenvironnement, en particulier les macrophages. Dans les organes hématopoïétiques, comme la rate et le foie, les macrophages jouent un rôle dans l'érythrophagocytose et régulent la disponibilité en fer nécessaire à l'érythropoïèse. S'il est décrit que les macrophages de phénotype M2 participent à la progression tumorale, leur impact sur la régulation de la disponibilité en fer pour les cellules tumorales et dans la mise en place des mécanismes de résistance restent encore non décrits dans les cancers.

Dans ce contexte, mon hypothèse est que le métabolisme du fer mitochondrial participe au maintien de l'activité mitochondriale nécessaire à la survie des cellules persistantes aux chimiothérapies actuelles. Le microenvironnement et plus précisément les macrophages contrôleraient cette régulation métabolique à la base de la résistance thérapeutique.

Dans ce projet, 3 objectifs ont été identifiés pour répondre à cette hypothèse :

1- Evaluer l'impact d'Eltrombopag sur le métabolisme mitochondrial

ELT, un agoniste du récepteur à la thrombopoïétine inhibe la prolifération cellulaire en séquestrant le fer cellulaire et en restaurant la différenciation des blastes leucémiques (Callens et al., 2010; Roth et al., 2012; Sugita et al., 2013). Cette molécule affecte le taux de ROS cellulaires et active les voies de signalisation *signal transducers and activators of transcription* (STATs) et *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NFκB) qui sont dérégulées dans les situations d'inflammation (Will et al., 2009). Cibler le métabolisme du fer dans les LAM pourrait conduire à des opportunités thérapeutiques dans le traitement des LAM mais également dans la régulation de l'inflammation associée. Sachant que l'activité anti-leucémique d'ELT est liée à sa capacité de chélation du fer, l'objectif a été d'établir l'impact de la molécule sur le fer mitochondrial et d'identifier les acteurs impliqués dans la réponse à cette molécule.

2- Etablir le rôle du fer mitochondrial dans la résistance thérapeutique des LAM

Plusieurs études ont montré que le métabolisme lié au fer est modifié chez les patients atteints de LAM. Cependant, la plupart de ces études se bornent à des mesures sériques (biomarqueurs) ou des analyses transcriptomiques. Ainsi, mon objectif a été d'évaluer si et comment le métabolisme du fer participe à la résistance des LAM et en particulier par quels mécanismes moléculaires et cellulaires, et si cela était à travers la régulation du métabolisme O_xPHOS.

3- Identifier le rôle du microenvironnement dans la régulation de la disponibilité en fer des cellules de LAM

Les voies de l'inflammation sont activées en réponse à la chimiothérapie par AraC. Le fer jouant un rôle déterminant dans l'inflammation et la fonction énergétique des cellules, les macrophages, par leur activité de recyclage, pourraient venir procurer le besoin en fer des cellules de LAM. Je me suis alors intéressée à caractériser le rôle du microenvironnement dans le contrôle et l'approvisionnement du fer dans les cellules leucémiques et plus particulièrement à évaluer la participation des macrophages dans cet apport.

Matériels et méthodes

I. Réactifs

Drogues et molécules :

L'AraC et l'Ida sont fournis par la pharmacie de l'Institut Universitaire du Cancer de Toulouse. Eltrombopag (ELT) est donné par Novartis. Venetoclax (ABT-199), est acheté chez MedChem (HY-15531). L'ensemble des inhibiteurs mitochondriaux sont achetés chez Sigma : oligomycine (Sigma-Aldrich, 75351), Antimycine A (Sigma-Aldrich, A8674), Roténone (Sigma-Aldrich, R8875), succinylacetone (Sigma-Aldrich, 20011), Ammonium iron(III) citrate (FAC ; Sigma-Aldrich, F5879), 2,2'-bipyridine (BIP ; Sigma-Aldrich, D216305), Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH; Abcam, ab145871), N-Methyl Mesoporphyrin IX (NMM; Santa Cruz, sc-396879), Busulfan (Sigma-Aldrich, B2635), 5-Aminolevulinic acid hydrochloride (ALA ; Sigma-Aldrich, A3785), Carbonyl Cyanide *m*-Chlorophenylhydrazone (CCCP ; Calbiochem, 215911), z-vad-fmk (Calbiochem, 627610), necrostatin-1 (Calbiochem, 480065).

Anticorps de western blot :

ACO2 (clone D6D9, CST, 6571S), α -actinine (CST, 3134), Actine (clone C4, Millipore, MAB1501), ALAS1 (Abclonal, A4817), ALAS2 (clone EPR15112, Abcam, ab184964), Bcl-2 (clone D55G8, CST, 4223), Caspase-3 (CST, 9662), Caspase-9 (CST, 9502), NAF-1/CISD2 (clone D4X4E, CST, 60758), COXIV (clone 3E11, CST, 4850), CPOX (Abclonal, A3807), cytochrome c (clone 6H2, Santa-cruz, sc-13561), frataxin (clone 18A5DB1, Abcam, ab110328), FTH1 (CST, 3998), FTL (Atlas Antibodies, HPA041602), FTMT (clone EPR1797, Abcam, ab124889), GAPDH (clone D16H11, CST), Hexokinase II (clone C64G5, CST), HO-1 (clone D60G11, CST), HSP90 (CST, 4874), IRP1 (clone D6S4J, CST, 20272), ISCU (Proteintech, 14812-1-AP), Mitoferrin1 (Proteintech, 26469-1-AP), CISD1/MitoNEET (clone D5M4C, CST, 83775), NFS1 (Proteintech, 15370-1-AP), OxPHOS (Abcam, ab110411), p53 (clone DO-1, santa cruz, sc-126), PARP clivé (BD Pharmingen, 556494), PCNA (clone PC10, CST, 2586), PGC1 α (clone 3G6, CST, 2178), TFAM (clone 18G102B2E11, Abcam, ab119684), α/β -Tubuline (CST, 2148), UROD (Atlas Antibodies, HPA028668), UROS (Atlas Antibodies, HPA044038), FECH (Atlas Antibodies, HPA044100). Les anticorps secondaires utilisés proviennent de chez Promega : anti-rabbit HRP (Promega, W4011), anti-mouse HRP (Promega, W4021)

Anticorps de cytométrie :

Anticorps anti-humain : CD45-BV510 (BD, 563204), AnnexinV-FITC (BD, 556420), AnnexinV-APC (BD, 550474), AnnexinV-V500 (BD, 561501), CD45-V450 (BD, 560367), CD45-APCH7 (BD, 641417), CD44-PECy7 (BD560533), CD11b-PE (Beckman Coulter, IM2581U), CD192-BV711 (BD, 747848), HLA-DR-BUV395 (BD, 564040), CD163-BV650 (BD, 563888), CD71-APCH7 (BD, 563671), CD14-Alexa Fluor 700 (BD, 557923), CD44-FITC (BD, 555478), CD80-BV421 (Biolegend, 305221)

Anticorps anti-murin: CD45.1-PERCPCy5.5 (BD, 560580), CD192-BV421 (BD, 747963), CD80-BV711 (BD, 740698), F4/80-BUV395 (BD, 565614), CD11b-PECy7 (BD, 552850), CD16-PECy7 (BD, 560716), CD14-APCFire750 (Biolegend, 123331), CD71-PE (Biolegend, 113807), CD163-PEDazzle594 (Biolegend, 155315), CD16.2-BV650 (Biolegend, 149533), CD206-BV605 (Biolegend, 321139)

II. Les modèles d'étude

Culture cellulaire de cellules de LAM

Les cellules de lignée de LAM proviennent de DSMZ (**Tableau 3**). Elles sont passées tous les deux jours à 0,3 Millions de cellules/mL en milieu *Minimum Essential Medium alpha* (MEM α ; Gibco) supplémenté de 10% sérum de veau fœtal (SVF) et 1% antibiotiques (pénicilline/streptomycine). Lorsqu'une manipulation est ensemencée, les cellules sont centrifugées et resuspendues à 0,4 M/mL dans du milieu de culture. Elles sont alors traitées aux doses et au temps souhaités.

Name	Gender	FAB	History	Model for	Mutational status										
					FLT3-ITD	NPM1	IDH1	IDH2	DNMT3A	CEBPa	Kit	NRas	KRas	p53	
KG1a	M	M0	Relapse	AML-M0	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	mut	wt	mutated
HL-60	F	M2	Dx	AML-M2	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	null; deleted
OCI-AML2	M	M4	Dx	DNMT3A	wt	wt	wt	wt	mut	wt	wt	wt	wt	wt	wt
OCI-AML3	M	M4	Dx	NPM1/DNMT3A	wt	mut	wt	wt	mut	wt	wt	wt	wt	wt	wt
MV4-11	M	M5	Dx	FLT3-ITD	ITD	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
MOLM14	M	M5	Relapse	FLT3-ITD	ITD	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
U937	M	M5	Refractory	CALM-AF10	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	null; deleted
K562	F			CML	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	mutated

Tableau 3: Caractéristiques des lignées de LAM utilisées. Name : nom de la lignée cellulaire, Gender : genre du patient à partir duquel la lignée a été établie, History : histoire du patient d'origine (Dx : diagnostic ; Relapse : rechute ; Refractory : réfractaire), FAB : classification FAB basée sur le stade de différenciation. Model for : profils associés au modèle d'étude, Mutational status : Profil mutationnel des lignées.

Les cellules primaires de patient sont isolées par ficoll. Le prélèvement de sang est déposé sur du ficoll (Ficoll-Paque Plus, Cytiva). Après centrifugation à 2000xg pendant 20 min, l'anneau de cellules mononucléées (PBMCs) est collecté et mis en culture à 0,5 M/mL en milieu *Iscove's Modified Dulbecco's Media* (IMDM ; Gibco) additionné de 20% SVF et antibiotiques.

Culture cellulaire de macrophages

Des PBMC de donneurs sains sont isolées sur gradient de ficoll. Les monocytes, précurseurs des macrophages, sont enrichis suivant les instructions fournisseur par un tri magnétique CD14 (Milteniy biotech) avant d'être mis en culture dans du milieu IMDM+20% SVF additionné de M-CSF à 20 ng/mL. Le milieu est changé tous les deux-trois jours. Les macrophages sont les cellules qui adhèrent au support.

Après 6 jours d'activation des macrophages par le M-CSF, les macrophages sont ensemencés en plaque 24 puits et polarisés avec les stimulations suivantes :

- M1 par ajout de LPS (100 ng/mL) et IFN γ (20 ng/mL)
- M2 avec les interleukines IL-4 (20 ng/mL) et IL-13 (20 ng/mL)
- L'appellation M0 est utilisée pour les macrophages non polarisés.

Après 24 h de stimulation, les blastes leucémiques de la lignée U937 sont ensemencés à 0.4 M/mL et ajoutés en co-culture par contact direct sur les macrophages et traités ou non avec AraC 2 μ M. Au terme de la co-culture, les cellules sont collectées et immunophénotypées par un marquage de cytométrie de flux (CMF) avec HLA-DR, CD14, CD16, CD71, CD80, CD192, CD163, CD206, AnnexinV.

Xénogreffe de LAM dans des souris NSG

Deux modèles de xénogreffe sont mis en place dans l'équipe pour l'étude de la LAM : des modèles établis à partir de cellules de patients (*Patient Derived Xenograft*, PDX) ou de lignées cellulaires de LAM (*Cell Lines Derived Xenograft*, CLDX) (Saland et al., 2015; Sarry et al., 2011). Ceux-ci reposent sur la reproduction de la pathologie dans des souris immunodéficiences de type NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl} / SzJ (NSG). Ces modèles sont dépourvus de cellules B, T et NK (Shultz et al., 2005).

Des souris NSG âgées de 6 à 8 semaines sont traitées par voie intrapéritonéale (*i.p.*) avec du busulfan à 20 ou 30 mg.kg⁻¹ (pour CLDX ou PDX respectivement). 24 h après le pré-conditionnement, 2 millions de cellules de LAM sont injectées en intraveineuse (*i.v.*) dans la veine caudale des souris. L'établissement de la maladie est analysé dans le sang avec un marqueur CD45 humain (clone HI30). Le comptage absolu est réalisé avec des billes de comptage absolu en cytométrie (*Precision Count Beads*, Ozyme).

Lorsque la maladie est établie, les animaux sont séparés en 4 groupes : contrôle, AraC, ELT, AraC+ELT. Ils reçoivent alors 5 jours de traitement en *i.p.* avec AraC 30 mg.kg⁻¹.jour⁻¹ et/ou ELT 100 mg.kg⁻¹.jour⁻¹. Les drogues utilisées sont respectivement solubilisées dans du PBS ou 10% DMSO, 50% PEG400, 40% PBS. Le bras contrôle reçoit le véhicule de chacune des molécules administrées.

Au terme du traitement, les souris sont disséquées. Les sternums sont collectés pour de l'immunohistochimie. La moelle osseuse des tibias et de fémurs et la rate des animaux sont dissociés dans 4 mL de HBSS+1% SVF. 200 µL de ces extraits sont utilisés pour chaque panel de cytométrie et lysés avec du chlorure d'ammonium pendant 5 min avant les marquages. Des anticorps CD45 humain (clone HI30) et un CD45.1 murins sont ajoutés dans chacun des panels de cytométrie pour dissocier les cellules humaines des cellules murines. Le comptage absolu est réalisé avec des billes de comptage absolu en cytométrie (Ozyme). Le nombre de blastes absolu est calculé grâce à la formule suivante :

$$\text{Blastes (Million)} = \frac{(\text{nombre de blastes acquis} * \text{nombre de billes totales dans le tube})}{(\text{nombre de billes acquises} * \text{volume échantillon})} * 10^{-6}$$

Immunohistochimie :

Les sternums des animaux sont collectés et conservés dans du Formol à 4%. Suite à une décalcification, ils sont pris en charge par la plateforme d'histologie pour la coloration (Unité mixte de recherche UMR006, Toulouse). Des colorations au bleu de Prusse (ou Perl's) et à l'hématoxyline-éosine (HE) sont réalisées puis les lames sont analysées au scanner de lames.

Transfection siRNA par électroporation avec le système Néon

5 millions de cellules MOLM14 sont centrifugées à 300xg pendant 4 min et lavées deux fois avec 10 mL de PBS avant d'être resuspendues suivant les instructions fournisseur dans 120 µL de tampon de resuspension fournit dans le kit (*Neon Transfection kit*, Invitrogen). 7.5 µL de siRNA à 20 µM sont ajoutés puis électroporés à l'aide de la pipette Néon à 1700 Volt pendant 20 msec (Programme 5, *Neon transfection system*). Après le pulse électrique, les cellules sont mises en culture dans 5 mL (1 Million/mL) de milieu MEMα additionné de 10% SVF pendant 24h.

Les siRNA utilisés sont commandés chez Sigma-Aldrich. 2 séquences par cible sont testées :

siFECH#1: 5'-GGUGUUAUUUAGAGAUCAA
siFECH#2: 5'-GGUGUUAUUUAGAGAUCAA

III. Méthodes d'analyse de la sensibilité cellulaire et d'expression des protéines

Quantification de la viabilité cellulaire et de l'apoptose

Les cellules sont lavées au PBS et 100 µL de tampon Annexine V binding buffer (10 mM Hépès, 140 mM NaCl, 250 µM CaCl₂, pH=7.4) comprenant 1 µL d'annexine V couplée à un fluorochrome et 0.2 µL de 7-aminoactinomycine D (7-AAD) (Sigma, A9400) est ajouté avant lecture au cytomètre de flux.

Purification des mitochondries

50 millions de cellules sont collectées et lavées deux fois au HBSS et resuspendues dans 1 mL de tampon MIB (200 mM Mannitol, 70 mM saccharose, 0.5 mM EGTA, 10 mM HEPES pH=7.2, cocktail inhibiteur de protéases et de phosphatases). Après 10 min d'incubation dans la glace, les cellules sont lysées au *dounce*. La lyse est validée par microscopie à contraste de phase. Une centrifugation de 10 min à 600xg et 4°C permet d'éliminer les noyaux et cellules non lysées. Le surnageant comprends les organites. Les mitochondries de ce surnageant sont culotées par une centrifugation à 10400xg pendant 10 min. 2 lavages de ce culot avec 1 mL de MIB et une centrifugation à 16000xg pendant 2 min permet d'obtenir la fraction mitochondriale (**Figure 18**). La pureté des fractions est validée par western blot avec des marqueurs du cytoplasme (GAPDH, Actine), du réticulum endoplasmique (PDI), du noyau (PCNA) et des mitochondries (COXIV).

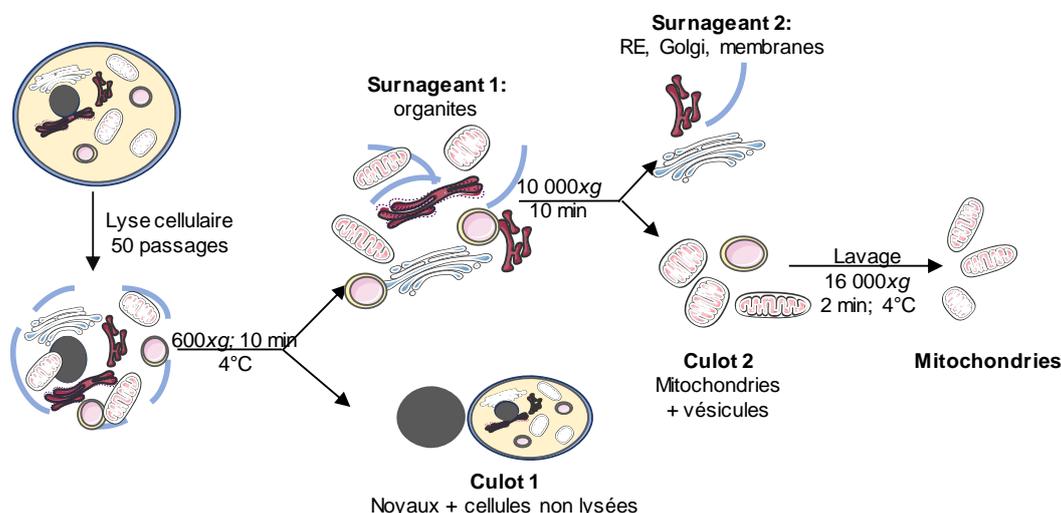


Figure 18: Etapes de la purification de mitochondries par centrifugation différentielle. Les cellules sont lysées par lyse mécanique (*dounce*, 50 passages). Une première centrifugation permet de séparer les noyaux et cellules entières des organites. Le surnageant est alors centrifugé 10 min à 10 000xg. Les mitochondries sont dans le culot qui est lavé pour éliminer les impuretés.

Mesure de la peroxydation des lipides : Bodipy-C11

Les lipides peroxydés sont mesurés avec la sonde Bodipy 581/591 C11 (Life Technology, D3861). Lorsqu'elle est oxydée le pic d'émission de fluorescence se déplace de 590 nm à 510 nm. Ainsi lorsqu'elle est réduite, la fluorescence peut être lue dans le canal PE (488/585 nm) et lorsqu'elle est

oxydée la sonde émet dans le canal FITC (488/525 nm). Des traitements 16 h avec des inhibiteurs (Ferrostatin-1 ; 10 μ M) et activateurs (RSL-3 ; 100 nM) de la ferroptose sont ajoutés pour valider la spécificité du marquage.

Après 1 lavage avec 2 mL de HBSS, les cellules sont incubées pendant 15 min avec une solution de C11-bodipy à 5 μ M contenant un marqueur de viabilité (Viability stain 780 ; BD). Après deux lavages en HBSS, les cellules sont resuspendues dans 200 μ L de HBSS puis le signal et la viabilité sont lu en cytométrie de flux (CytoFLEX).

Sensibilité des cellules aux molécules

Les IC₅₀ sont obtenues à partir des viabilités observées avec un marquage de cytométrie en Annexine V en réponse aux molécules AraC ou ELT et calculées à l'aide de GraphPAD Prism. Les indices de combinaison sont générés avec Combosyn (www.combosyn.com).

Expression protéique par western blot

Le niveau d'expression des protéines est analysé par western blot. Pour cela les cellules sont resuspendues dans un tampon de lyse 1X (50 mM Tris pH=7,4 ; 200 mM NaCl ; 1% DOC ; 2% Triton X-100 ; 2 mM EDTA) additionné d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases 1X (Sigma-Aldrich, PPC1010). Après sonication (3 pulses de 7 sec ; 50% de la puissance, Vibra-Cell 72446 ; Bioblock), les protéines sont quantifiées en microplaque suivant les instructions fournisseur avec le kit *Biorad protein Assay* basé sur un dosage à la méthode de Bradford (Biorad). Ainsi, 15 μ g de protéines sont préparées avec du tampon Laemmli 1X (40 mM Tris pH=6,8, 1,5% SDS ; 5% glycérol ; 0,08% bleu de Bromophénol ; 25 mM DTT) et chargées sur gel de polyacrylamide 4-12% (NuPage Gel, Invitrogen). Après séparation pendant 1h15 à 100 volts, les protéines du gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham) pendant 1 h à 100 volts. Après transfert, les sites non-spécifiques sont saturés avec une solution de Tris-buffered saline contenant 0.1% de Tween-20 (TBS-T) et 5% d'albumine de sérum bovin (BSA) pendant 1 h à température ambiante. Puis les anticorps primaires sont incubés sur la membrane pendant une nuit à 4°C. Après 3 lavages avec du TBS-T, les anticorps secondaires couplés à la HRP sont ajoutés pendant 1 h. Suite à 3 derniers lavages, les anticorps sont détectés avec une solution d'ECL sur l'imageur PXi (Syngene).

Préparation d'extraits pour les analyses protéomiques

2 Millions de cellules préalablement traitées sont lavées deux fois avec 1 mL de PBS froid. Le culot est alors conservé à l'azote liquide pour éviter toute dégradation et confié à la plateforme de protéomique du pôle technologique du centre de recherche en cancérologie de Toulouse pour les analyses en spectrométrie de masse. La valeur de significativité en t-test (p-value) entre les points traités et non-traités (n=3 pour chacun) est calculée. Ainsi les protéines dont le taux de variation est inférieur à 0.5 pour les protéines sous-exprimées et supérieure à 2.0 pour les protéines sur-exprimées en réponse à la molécule constituent la signature protéique de la réponse à ELT. Les voies régulées sont analysées sur Toppgene (Chen et al., 2009).

Dosage multiplexé des cytokines par cytométrie en flux

Les cytokines sont quantifiées à l'aide du kit LegendPLEX « *Microglia/Macrophage 13plex panel* ». Cette méthode de dosage comprend des billes d'intensité de fluorescence différente. Chaque intensité de fluorescence de bille dans le canal APC (ex/em : 638nm/660nm) est alors associée à un anticorps reconnaissant sa cytokine d'intérêt (**Figure 19B**). Dans notre panel nous pouvons détecter : IL-18, IL-23, TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12p70, IL-12p40, G-CSF, CCL22, IL-10, CCL17, CXCL1, TGF β 1.

Le plasma est collecté après une centrifugation de 20 minutes à 1000xg de sang collecté sur tube hépariné. 50 μ L de plasma dilué au 1/4 dans l'*Assay buffer* sont incubés pendant 2 heures sous agitation avec les billes. Chaque bille est spécifique d'une cytokine et possède une intensité de fluorescence dans le canal APC qui est propre à sa cytokine. Suite à deux lavages avec le tampon fourni dans le kit (« *wash buffer* »), 25 μ L de solution contenant les anticorps biotinylés est ajoutée pendant 1 heure sous agitation. Ceux-ci vont se fixer aux cytokines qui ont préalablement interagit avec les billes. Enfin, 25 μ L de streptavidine-PE sont ajoutés et incubés pendant 30 min sous agitation (**Figure 19A**). La streptavidine se lie à la biotine des anticorps biotinylés. La PE (R-Phycoérythrine) couplée à la biotine permet une détection par fluorescence en cytométrie de flux (488/580). Après deux lavages en *wash buffer*, les billes sont resuspendues dans du tampon *wash buffer* et le signal est analysé en CMF à l'aide du CytoFLEX (**Figure 19C**). Une gamme étalon de cytokines est réalisée avec la solution standard fournie et une série de dilutions au 1/4.

L'avantage de cette méthode réside dans la quantité faible de sérum nécessaire pour l'analyse.

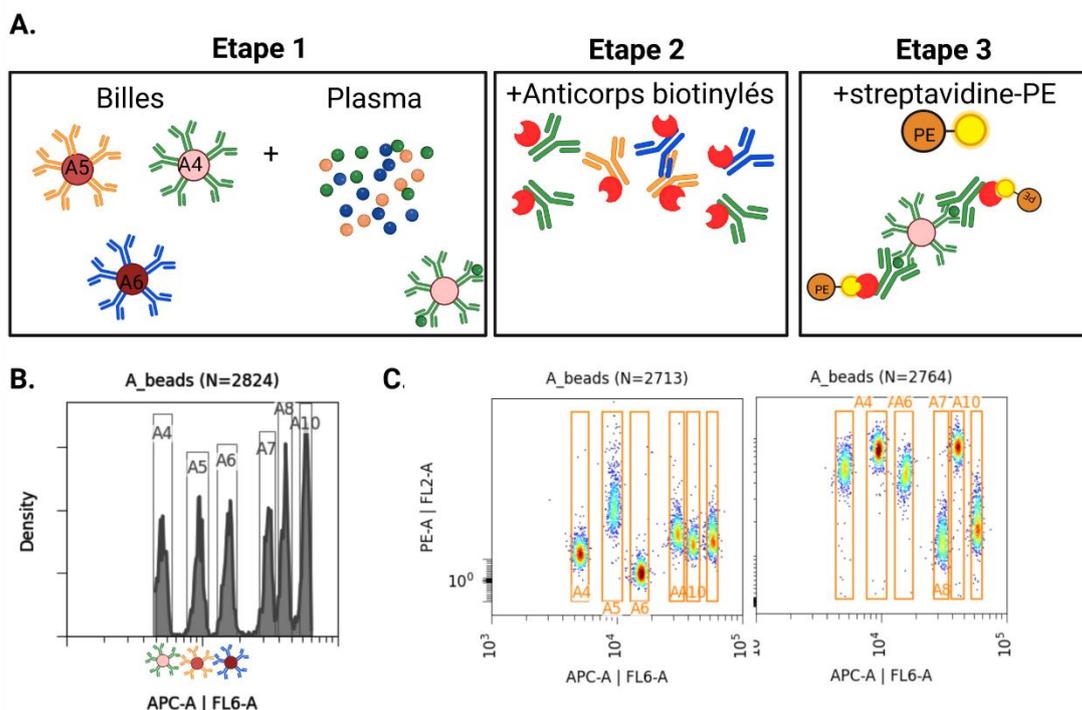


Figure 19: Analyse des cytokines par méthode multiplexée en cytométrie de flux. (A) méthode de marquage. La première étape consiste à incuber les billes spécifiques des cytokines avec le plasma collecté. En deuxième lieu, un mix d'anticorps couplés à la biotine spécifiques des cytokines d'intérêt est ajouté et incubé avec les billes sur lesquelles les cytokines se sont liées spécifiquement. Une dernière étape permet la liaison de la streptavidine couplée à un PE sur les biotines des anticorps. (B) les billes spécifiques d'une cytokine comportent suivant la cytokine d'intérêt une fluorescence en APC qui lui est propre. (C) La fixation de la streptavidine PE sur l'anticorps biotinylé permet alors une lecture sur le canal PE. L'intensité de fluorescence dans ce canal est proportionnelle à la concentration en cytokine. A gauche, le signal négatif sans cytokine (gamme à 0 μ g) et à droite du panel, les résultats obtenus sur un sérum de souris xénotreffée.

L'intensité de fluorescence du PE est proportionnelle à la quantité de cytokine de l'échantillon. L'intensité en APC permet de dissocier les billes et par conséquent la cytokine dosée.

Dosage d'ELT dans le plasma des souris

La molécule ELT possède des propriétés de fluorescence (488/610 nm). J'ai ainsi dérivé cette caractéristique optique pour mettre en place un essai de dosage de la molécule.

Le plasma est collecté après une centrifugation de 20 minutes à 1000xg de sang collecté sur tube hépariné. Une gamme de concentration de la molécule dans du plasma de souris non-traitée est réalisée (50 µL/puit). 50 µL de plasma sont mis dans des puits d'une plaque 96 puits. L'intensité relative de fluorescence est lue au lecteur de plaque Clariostar.

IV. Méthodes de caractérisation de l'homéostasie du fer

Expression de la Ferritine FTH1 en cytométrie de flux

Afin de déterminer l'expression de la ferritine dans les blastes leucémiques (pathologie hétérogène), j'ai développé un marquage en CMF. 1 million de cellules sont lavées au PBS puis incubées pendant 30 minutes avec les marqueurs de surface : CD45 (leucocytes), CD71 (récepteur à la transferrine) et un marqueur de viabilité. Après lavage les cellules sont fixées et perméabilisées suivant les recommandations fournisseur du kit « *FoxP3 Fixation perméabilisation* » (Thermo Fisher Scientific). Dans ce protocole, après marquage avec les anticorps, les cellules sont lavées avant d'être perméabilisées 20 minutes avec le tampon de perméabilisation 1X fourni dans le kit. Suite à deux lavages avec un tampon contenant de la BSA qui permet de saturer les sites de fixation non spécifiques, les cellules sont incubées pendant 1 h avec 200 µL d'anticorps FTH1-FITC dilué au 1/100^e (Novus). Suite à deux lavages, les cellules sont resuspendues dans du PBS puis l'intensité de fluorescence (MFI) est analysée en CMF.

Quantification de la protoporphyrin IX en cytométrie de flux

L'intermédiaire de la biosynthèse des hèmes, la PpIX, est auto-fluorescente. Elle est excitée à 409 nm et émet à 633 nm. Ainsi, j'ai développé un essai de cytométrie basé sur ces propriétés pour quantifier cette molécule dans les cellules de LAM. Pour cela, j'ai modifié le banc optique du cytomètre en utilisant un filtre bande passante de 630 nm sur le laser 488 nm. La fluorescence collectée est alors liée à cette molécule. Afin de déterminer la capacité de la voie de biosynthèse, j'incube les cellules pendant 4 heures avec un précurseur de la voie : l'ALA. L'accumulation de celui-ci me permet alors de déterminer l'activité des étapes précoces de la voie (**Figure 20**).

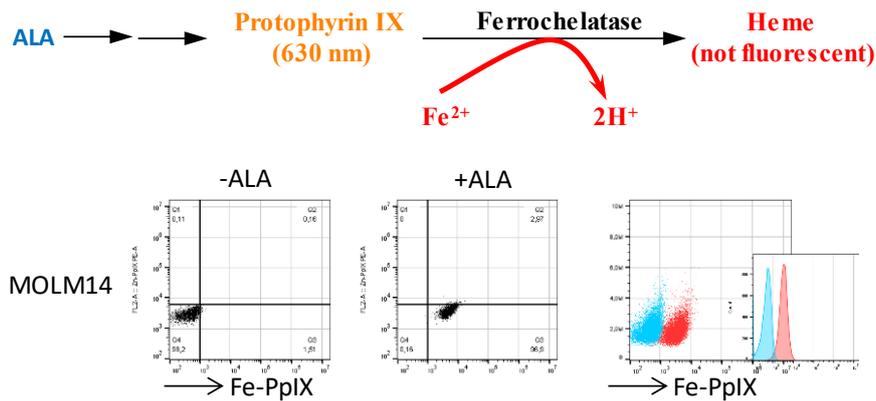


Figure 20: Flux d'incorporation de PpIX : activité de la voie de biosynthèse des hèmes. La concentration de PpIX intracellulaire peut être déterminée par autofluorescence de la molécule (488/630). L'activité de la voie peut être modélisée avec ajout d'ALA pendant 4 h dans le milieu. Son accumulation est représentative des étapes précoces de la voie et de l'activité de la FECH qui permet la conversion de cet intermédiaire en hème non fluorescent.

Mesure du fer libre intracellulaire par cytométrie de flux

Pour quantifier le fer libre dans les cellules, la Calcéine-AM (Life Technology) est utilisée. Les estérases des cellules viables la convertissent en Calcéine. La fluorescence de la Calcéine est éteinte par les ions divalents et trivalents (Fe^{3+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} and Mn^{2+} mais pas Ca^{2+} et Mg^{2+}). Lorsque l'on ajoute dans le milieu des chélateurs des ions Fe^{2+} et Fe^{3+} , le différentiel de fluorescence représente la quantité d'ions ferriques et ferreux qui piègent la fluorescence de la sonde.

Les cellules sont incubées 20 min avec de la Calcéine à 5 μM . Suite à deux lavages avec du Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), les chélateurs du fer 2,2'-bipyridine (BIP) et pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) sont ajoutés pendant 1 h avant lecture de la fluorescence à 488/525 (Ex/Em). La différence d'intensité de fluorescence (MFI) entre le point contrôle et la condition (BIP+PIH) représente la concentration en fer libre dans les cellules.

$$\text{Fer libre (LIP)} = \text{MFI calcéine}_{\text{BIP+PIH}} - \text{MFI calcéine}_{\text{basal}}$$

Echantillonnage pour quantification du fer intracellulaire par spectroscopie de Mössbauer

Les cellules sont cultivées pendant 1 semaine en milieu MEM α + 10% SVF additionné avec du citrate de fer ($^{57}\text{Fe}^{\text{III}}$ citrate) à 20 μM . Pour limiter la contamination liée à l'apport de fer et aux molécules ferriques présentes dans le sérum, le dernier passage réalisé la veille du traitement, se fait en milieu 5% SVF. Le jour de l'ensemencement, 700 millions de cellules par condition sontensemencées à 0.5 M/mL puis traitées avec ELT 10 μM ou son solvant (DMSO). Un contrôle avec de la DFO 10 μM , chélateur du fer a été réalisé en parallèle.

Après 24 h de traitement à 37°C, 700 millions de cellules sont centrifugées à 800xg pendant 10 min à 4°C. Les culots collectés sont lavés deux fois avec 100 mL de PBS 1X + 1 mM EGTA. Puis, un troisième lavage en PBS sans EGTA est réalisé. Après élimination du surnageant, le résiduel de PBS est éliminé avec une nouvelle centrifugation à 800xg pendant 10 min, 4°C. 600 mg de culot cellulaire sont mis dans une capsule Mössbauer puis mises dans l'azote jusqu'à analyse au CEA de Grenoble (Jean-Marc Latour).

V. Méthodes d'étude du métabolisme cellulaire

Analyses métabolomiques :

Métabolites intracellulaires : 2 millions de cellules sont collectés par aspiration sur filtre de polyamide 0.45 µM (Sartorius). Des contrôles sans cellules sont réalisés dans les mêmes conditions. Le filtre est lavé par du NaCl 0.9% à volume équivalent au volume du milieu filtré avant d'être rapidement immobilisé à l'azote liquide. Un standard est ajouté à chaque échantillon (*Isotope Dilution Mass Spectroscopy*). Les métabolites sont extraits avec du méthanol. Les métabolites présents sur les filtres sont dissous 15 min dans 3 mL de MetOH 80% à -80°C avant une première centrifugation de 5 min à 2000xg à -20°C. Le surnageant est collecté et le filtre et culot (débris cellulaires) sont lavés deux fois avec 1 mL de MetOH 80%. Les extraits sont ensuite évaporés et lyophilisés avant d'être analysés en chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC-MS) sur la plateforme MetaTOUL (Toulouse).

Métabolites extracellulaires : Les surnageant de 2 mL de cellules sont collectés avec une seringue montée avec un filtre de polyamide de 0.22 µM. Les milieux collectés sont analysés en résonance magnétique nucléaire (RMN) sur la plateforme MetaTOUL (Toulouse).

Ces analyses permettent de refléter le métabolisme central mais pas les activités métaboliques. Pour amener plus loin la compréhension du métabolisme des tests fonctionnels présentés ci-dessous sont nécessaires.

Mesure des sites de production de l'ATP

Les cellules sont centrifugées et resuspendues à 0.3 M/mL dans du milieu complet. 80 µL de suspension cellulaire sont mises dans une plaque 96 puits à luminescence en triplicat avant traitement avec : PBS pour mesurer l'ATP basal, sodium iodoacétate (iodo) 100 µM pour inhiber la production d'ATP provenant de la glycolyse, oligomycine 1,6 µM et antimycine A 100 µM pour inhiber la part d'ATP produit par la mitochondrie et enfin la combinaison des 3 inhibiteurs afin de soustraire l'ATP produit par les autres sources.

Après 1 h d'incubation à 37°C, 5% CO₂, 100 µL de kit *Cell titer Glo* de Promega (Promega, G7573) sont ajoutés. Ce réactif est basé sur une mesure d'ATP par luminescence. Le signal luminescent lu (RLU) au Clariostar après 10 min d'incubation avec le réactif est proportionnel à l'ATP produit pendant l'heure d'incubation à 37°C. Ainsi la part enlevée par les inhibiteurs reflète la production par les différentes voies. Pour le calcul de l'ATP mitochondrial la formule suivante est appliquée :

$$Mito\ ATP = \frac{(RLU_{basal} - RLU_{résiduel}) * 100}{(RLU_{iodo} - RLU_{résiduel})}$$

Mesure de la respiration cellulaire par Seahorse

La technologie SeaHorse (Agilent) permet de mesurer la consommation en oxygène et l'acidification du milieu. Au laboratoire nous possédons le XFe24. 200 000 cellules sontensemencées en triplicatas dans la plaque préalablement traitée avec du Cell tak (Corning) pour permettre l'adhésion des cellules de LAM. Après 1 h d'incubation à 37°C sans CO₂, la plaque peut être lue. Ainsi la cartouche préalablement préparée va injecter successivement : a/ l'oligomycine (1 µM), inhibiteur de l'ATP synthase qui permettra alors de définir la part de respiration liée à la production d'ATP ; b/ le CCCP (1 µM),

agent découplant. Celui-ci est un ionophore c'est-à-dire qu'il dissipe le gradient de protons dans la membrane mitochondriale. La cellule essaie alors de compenser en activant au maximum le complexe IV pour rétablir l'équilibre ; c/ roténone et antimycine A (Rot+AA ; 0.5 μ M) qui inhibent respectivement les complexes I et III de la chaîne respiratoire. Ainsi, cette combinaison va permettre d'établir la respiration non liée à la mitochondrie (**Figure 21**).

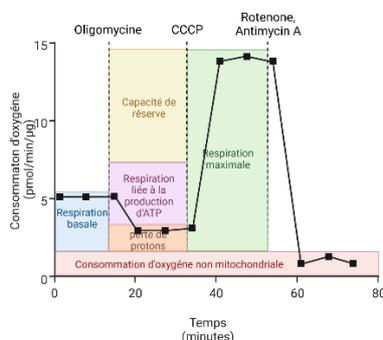


Figure 21: Tracé de respiration cellulaire par Seahorse. Après mesure de la valeur de consommation d'oxygène basale, l'injection d'Oligo, inhibiteur de l'ATP synthase permet de définir la part de la consommation d'oxygène liée à la production d'ATP mitochondrial. L'injection de CCCP, agent découplant de la mitochondrie « force » les cellules à la consommation d'oxygène maximale pour essayer de rétablir le gradient de protons. Ce composé permet alors de mesurer et la capacité respiratoire et la respiration maximale. L'ajout de roténone et AA inhibent toute activité mitochondriale (ECT-I et ETC-III).

Les essais en seahorse ou ATP impliquent une analyse qui soit ne prends pas en compte l'hétérogénéité cellulaire, soit nécessite un tri cellulaire, pouvant être source de stress pour les cellules, avant expérience. Ainsi ces essais peuvent être complétés par des expériences de cytométrie de flux qui permettent d'une part de limiter la quantité de matériel biologique nécessaire et ont l'avantage de pouvoir dissocier les sous-populations cellulaires.

Mesure du métabolisme énergétique par cytométrie de flux : méthode Scénith

Pour le marquage du métabolisme énergétique, j'ai mis en place au sein du laboratoire la méthode Scénith (Argüello et al., 2020). Cette technique est basée sur l'intégration de la puromycine (Puro), antibiotique analogue des ARNt-Tyr, qui s'insère dans le site A des ribosomes et est ajouté dans le site de terminaison de la synthèse peptidique. Son incorporation reflète alors la synthèse protéique (Azzam and Algranati, 1973). Un marquage avec un anticorps spécifique de la Puro permet alors de déterminer la quantité de Puro incorporée. Dans leur méthode, R. Argüello et ses collaborateurs ont montré que la synthèse protéique est corrélée à la production d'ATP des cellules. Ainsi la différence d'incorporation de Puro entre un tube contrôle et des inhibiteurs des voies de la glycolyse (2-deoxyglucose, DG) ou du complexe V de la chaîne respiratoire (oligomycine, Oligo) détermine la participation de chaque voie métabolique pour la production d'énergie. Un traitement avec l'Harringtonine (Hr), bloqueur de la traduction sert de contrôle négatif (**Figure 22**).

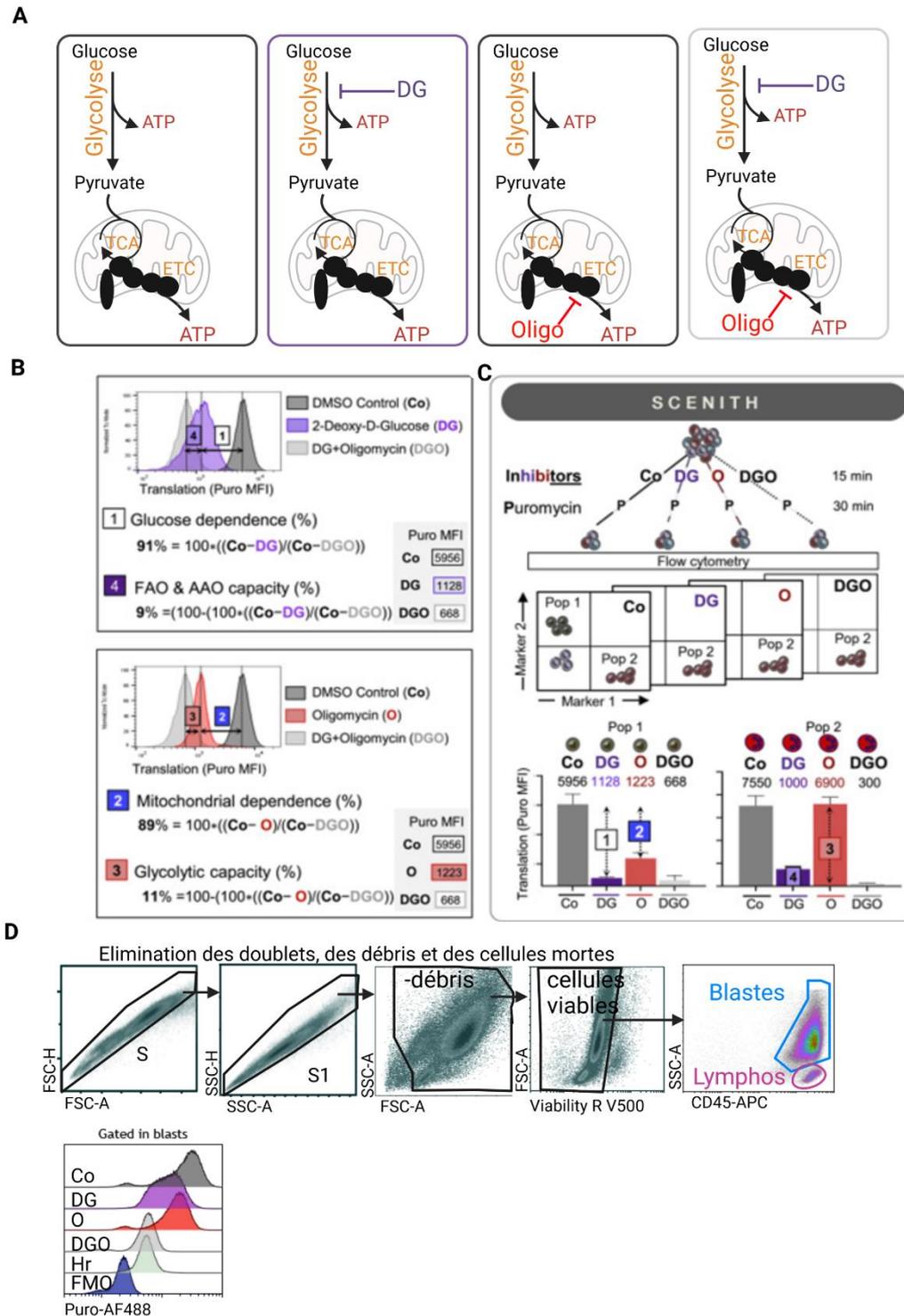


Figure 22: Mesure du métabolisme par cytométrie de flux. (A) Les cellules sont incubées avec des inhibiteurs des voies glycolytiques (2-déoxyglucose, DG) et/ou mitochondriales avec un inhibiteur de l'ATP synthase (Oligomycine, Oligo). (B) La puro est incorporée à la synthèse protéique reflétant la traduction liée aux différentes voies de production d'ATP. Ainsi un anticorps anti-Puro est ajouté et les différences d'intensité fluorescence entre les différents traitements permettent de calculer la dépendance aux différentes voies de production de l'ATP. (C) L'avantage de la méthode en cytométrie consiste à la dissociation de sous-populations cellulaires en s'affranchissant d'un tri préalable. (D) Stratégie d'analyse des cellules pour analyse des patients. Les doublets sont éliminés avec les paramètres de la taille (FSC) et granulosité (SSC) aire vs hauteur. Puis les débris cellulaires sont exclus avec un plot FSC-A/SSC-A avant sélection des cellules vivantes avec le marqueur de viabilité. Enfin, le CD45 permet de sélectionner les populations cellulaires et en particulier les blastes dans lesquels l'intensité de fluorescence en AF488 associé à l'anticorps anti-Puro reflète la quantité de Puro accumulée dans les cellules en réponse aux différents inhibiteurs.

Dans cette technique, les cellules sontensemencées à 1 M/mL en milieu IMDM contenant 20% de SVF et incubées pendant 1 heure avec 2-DG (100 mM), Oligo (1 µM), la combinaison 2-DG et Oligo, l'harringtonine (2 µg/mL), ou DMSO (contrôle ; Co). La puromycine (20 µg/mL) est ajoutée 10 min après les inhibiteurs. Après 1 h d'incubation, les anticorps de surface et le marqueur de viabilité (CD45-APC clone HI30 ; viability reagent V500, BD) sont ajoutés au milieu et incubés pendant 20 min à 37°C. Après lavage les cellules sont fixées et perméabilisées suivant les instructions du fournisseur du kit « *FoxP3 Fixation perméabilisation* » (thermo fisher scientific). Dans ce protocole, après marquage avec les anticorps, les cellules sont lavées avant d'être perméabilisées 20 minutes avec le tampon de perméabilisation 1X fournit dans le kit. Suite à deux lavages avec un tampon contenant de la BSA qui permet de saturer les sites de fixation non spécifiques, les cellules sont incubées pendant 1 h avec 100 µL d'anticorps anti-Puro AF488 dilué au 1/100^e. Suite à deux lavages, les cellules sont resuspendues dans du PBS puis analysées en CMF avec le cytomètre CytoFLEX. La fluorescence de la Puro est analysée dans les blastes viables (**Figure 22D**).

Mesure du potentiel de membrane mitochondrial et de la masse mitochondriale par cytométrie de flux

La masse mitochondriale et le potentiel de membrane mitochondrial sont respectivement mesurés avec les sondes Mitotracker green (MTG ; Life technology) et Tetramethylrhodamine ethyl ester perchlorate (TMRE ; Sigma Aldrich). Après 1 lavage avec 2 mL de HBSS, les cellules sont incubées pendant 20 min avec 200 µL de solution de marquage (HBSS + anticorps de surface + TMRE 200 nM + MTG 100 nM). Après deux lavages en HBSS, les cellules sont resuspendues dans 200 µL de tampon de marquage annexine V et 1 µL de d'annexine V. Un tube traité au CCCP, un agent découplant, est utilisé pour contrôle négatif du TMRE. Les signaux sont analysés en cytométrie de flux dans les cellules viables (Annexine V⁻) dans le canal PE (488/585 nm) pour le TMRE et FITC (488/525 nm) pour le MTG

Mesure du statut redox par cytométrie de flux : DCF-DA

Les ROS sont mesurés avec la sonde DCF-DA (Life Technology, D399). Cette sonde lorsqu'elle est oxydée par les ROS devient fluorescente dans le canal FL-1 (FITC : 488/525 nm). Après 1 lavage avec 2 mL de HBSS, les cellules sont incubées pendant 20 min avec une solution de DCF-DA à 5 µM. Après deux lavages en HBSS, les cellules sont resuspendues dans 200 µL de tampon de marquage annexine V et 1 µL de d'Annexine V. L'analyse est réalisée en CMF sur le CytoFLEX dans les cellules viables (Annexine V⁻) sur le canal FITC (488/525 nm).

Mesure des activités enzymatiques :

Activité du complexe I (NADH déshydrogénase) : Les cellules sont collectées et lavées deux fois avec 1 mL de PBS 1X avant d'être resuspendues à 1 Millions/mL dans du tampon de lyse LY-ETCI (1X :50 mM sodium phosphate buffer pH=7.5, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT) supplémenté avec des inhibiteurs de protéases et de phosphatases. Après 3 cycles de sonication (15 sec, 50% de la puissance, Vibra-Cell 72446 ; Bioblock) dans la glace, les protéines sont dosées et diluées à 4 µg/µL dans du tampon sodium phosphate 50 mM, pH=7.4. Dans une plaque 96 puits, 100 µl d'extraits protéiques (400 µg/puits) sont déposées en triplicatas. Ensuite, le mix réactionnel (50 mM sodium phosphate buffer pH=7.4, 5 mg/mL BSA sans acides gras, 2.5 mM cyanure de potassium, 250 µM ubiquinone 1). Dans le V0, la roténone à 10 µM est ajoutée. La réaction démarre grâce à l'ajout de 20 µL de NADH à 10

mM ($\epsilon=6.22 \times 10^{-6} \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). La vitesse de consommation de NADH est lue à 37°C par spectrophotométrie à 340 nm (**Figure 23A**).

Activité du complexe II (Succinate déshydrogénase) : Les cellules sont collectées et lavées deux fois avec 1 mL de PBS 1X avant d'être resuspendues à 1 Millions/mL dans du tampon de lyse LY-ETCII (1X :50 mM sodium phosphate buffer pH=7.5, 1 mM EDTA, 0.1% n-Dodecyl- β -D-Maltopyranoside) supplémenté d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases. Après sonication de 4 pulses de 15 sec (50% de la puissance, Vibra-Cell 72446 ; Bioblock) dans la glace, les protéines sont dosées et diluées à 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dans du tampon sodium phosphate 50 mM, pH=7.4. Dans une plaque 96 puits, 100 μL d'extraits protéiques (10 μg) sont déposées en triplicatas. Ensuite, le mix réactionnel (50 mM Sodium phosphate buffer pH=7.4, 5 mg/mL BSA sans acides gras, 1 mM cyanure de potassium, 0.5 mM antimycine A, 250 μM DCIP, 50 mM succinate, 12.5 mM roténone) est ajouté. Dans le V0, le malonate ou le TTFA inhibiteurs du complexe II sont ajoutés. La réaction démarre avec ajout de 20 μL de Decylubiquinone B à 500 μM . Le FADH_2 produit par la réaction enzymatique réagit avec le DCIP pour former un leucodérivé incolore. Cette réaction est suivie à 600 nm ($\epsilon=19.1 \times 10^{-6} \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) dans une atmosphère régulée à 37°C (**Figure 23B**).

Activité aconitase : Les cellules sont collectées et lavées deux fois avec 1 mL de PBS 1X avant d'être resuspendues à 1 Millions/mL dans du tampon de lyse LY-ACO (210 mM Mannitol, 70 mM sucrose, 5 mM HEPES-KOH pH=7.2, 1 mM EGTA). Après lyse cellulaire par 4 cycles congélation/décongélation dans l'azote/37°C, les extraits sont centrifugés 10 min à 20000xg. Les protéines du surnageant sont dosées et diluées à 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dans du tampon sodium phosphate 50 mM, pH=7.4. Dans une plaque 96 puits UV, 50 μg d'extraits protéiques sont déposés en triplicatas. Ensuite, le mix réactionnel (Tris-HCl 50 mM, Aconitate 1 mM, NADP+ 0.5 mM, IDH 1 U/mL, MnCl_2 1 mM, pH=7.0) est ajouté et la formation de NADPH est suivie en continu à 340 nm ($\epsilon=6.22 \times 10^{-6} \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Le contrôle de spécificité (V blank), comprends les mêmes réactifs sans l'aconitate (**Figure 23C**).

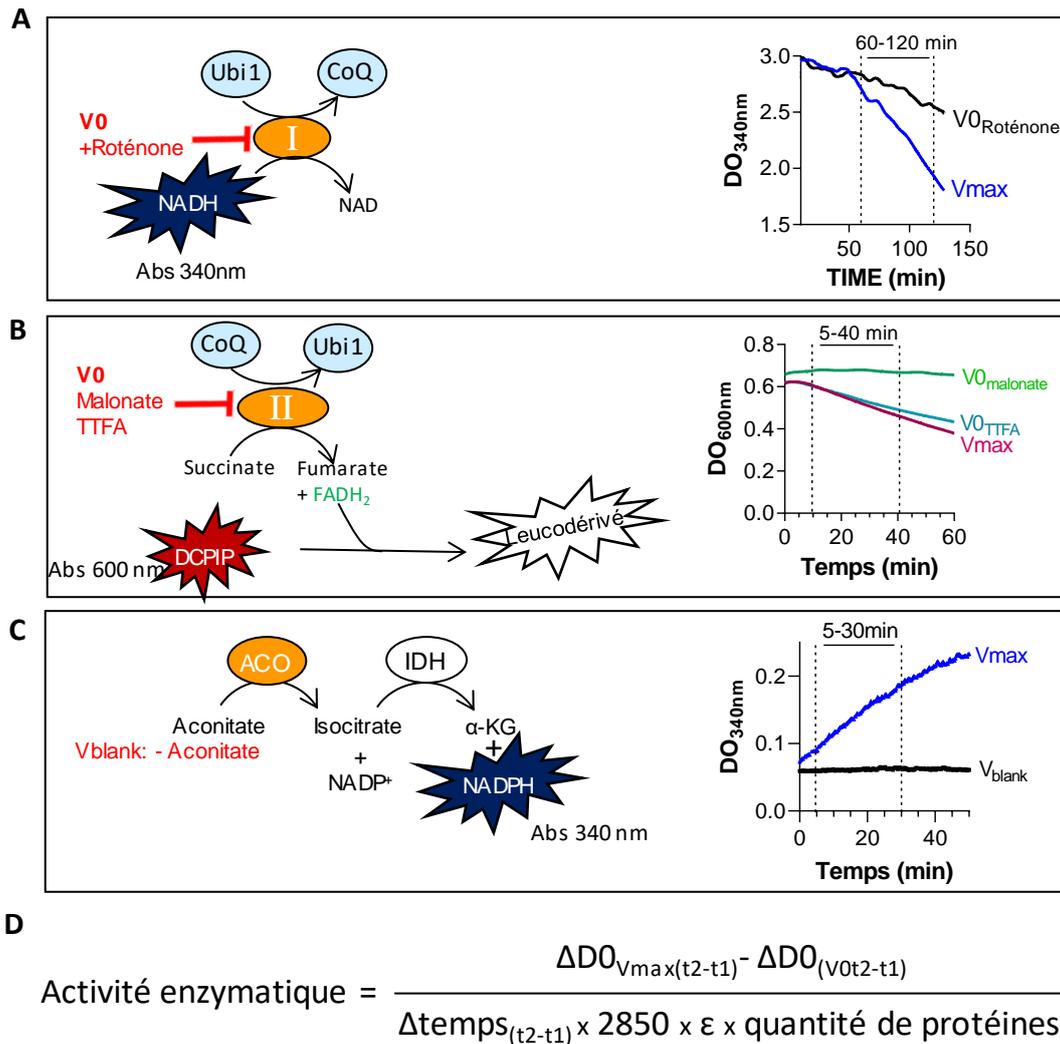


Figure 23: principe de mesure des activités enzymatiques. (A) L'activité du complexe I est mesurée par lecture directe de la consommation de NADH à 340 nm (UV). Les cofacteurs nécessaires à la réaction sont ajoutés (Ubiquinone, NADH). La rotenone sert à déterminer la part de consommation de NADH non liée à l'activité du complexe I. **(B)** Activité du complexe II. La lecture du complexe II est une lecture directe. Nous suivons une disparition du DCPIP à 600 nm. Cette molécule réagit avec le FADH₂ produit par l'enzyme. Le malonate et la TTFA sont des inhibiteurs de l'activité du complexe II. **(C)** Activité de l'aconitase. C'est une mesure indirecte. La réaction de l'enzyme produit de l'isocitrate. On ajoute alors une deuxième enzyme, l'isocitrate déshydrogénase (IDH) avec son cofacteur (NADP⁺). L'IDH en transformant l'isocitrate produit du NADPH qui peut être suivi à 340 nm. Un blanc sans aconitate est réalisé. **(D)** Formule de calcul des activités enzymatiques. Le facteur 2850 permet de s'affranchir du trajet optique. ϵ : coefficient d'extinction molaire, t₁=temps1, t₂=temps2

Statistiques :

Les graphiques représentent la moyenne +/-SEM et les statistiques sont réalisées avec un test statistique non-paramétrique de Mann & Whitney (* p<0.05, ** p<0.001, ***p<0.0001, **** p<0.00001). Pour les échantillons de patients, les tests réalisés sont appariés.

Résultats

Partie 1 – Eltrombopag chélate le fer mitochondrial dans les LAM

Eltrombopag (ELT), une molécule agoniste du récepteur à la thrombopoïétine, conduit à la production de plaquettes par activation des voies JAK2/STAT5 (Ghanima et al., 2019). Cependant, son effet anti-leucémique dans les LAM est indépendant de l'expression du récepteur à la TPO (Sugita et al., 2013). Cette molécule chélate le fer intracellulaire ce qui induit un blocage du cycle cellulaire, la différenciation dans la voie monocyttaire, une diminution rapide des ROS et une mort cellulaire par apoptose (Kalota et al., 2015; Roth et al., 2012; Will et al., 2009). Elle possède également, *via* ses propriétés de chélation du fer, la capacité de modifier la polarisation des macrophages *in vitro* (Di Paola et al., 2020). Cependant, le retrait de la molécule en association avec la chimiothérapie d'induction conventionnelle (AraC et Ida) ou azacitidine en essai de phase II demande aujourd'hui de mieux caractériser les voies impliquées dans la réponse à cette molécule ainsi que les mécanismes de résistance associés pour utiliser la molécule dans les meilleures conditions (Dickinson et al., 2018; Drexler and Passweg, 2021; Frey et al., 2019). En effet, les associations réalisées ne sont peut-être pas adéquates au mécanisme d'action d'ELT. Du coup, notre premier objectif ici a été de mieux caractériser le mécanisme d'action d'ELT dans les LAM.

ELT induit de la mort cellulaire dans les LAM

Les mécanismes de mort cellulaire en réponse à ELT ne sont pas totalement décrits. Il est indispensable de mieux caractériser la sensibilité des cellules de LAM à cette molécule ainsi que les mécanismes mis en jeu dans cette mort cellulaire. Aujourd'hui les études menées sur la molécule analysent son effet au-delà de 36 h de traitement. Dans l'objectif d'étudier le métabolisme, ces temps tardifs posent une limite dans la disponibilité des nutriments. Dans un premier temps, j'ai alors étudié la capacité de la molécule ELT à induire de la mort dans les cellules de LAM dans les conditions de culture du laboratoire. La viabilité cellulaire est mesurée en cytométrie en flux par un marquage à l'annexine-V. L' IC_{50} correspond à la dose nécessaire pour induire une inhibition de viabilité de 50% comparé au point non-traité. Les IC_{50} à 24 h de traitement de la majorité des lignées cellulaires LAM sont comprises entre 20 et 40 μ M (**Figure 24A**). Seule la lignée de LAM KG1a est résistante à cette molécule. J'ai alors analysé la réponse à ELT dans les blastes issus de patient LAM. Après exclusion des sous-populations non-blastiques (lymphocytes, monocytes, granulocytes) sur les paramètres de granulosité (SSC-A) et l'expression du CD45, la viabilité est analysée par marquage à l'Annexine V dans les cellules leucémiques (**Figure 24B**). Dans une cohorte de 78 échantillons de patient traités *ex vivo*, la médiane d' IC_{50} à 24 h est de 145.5 μ M (**Figure 24C**). Ces résultats m'ont permis de définir les doses utilisées pour la suite de l'étude. Pour étudier des réponses précoces indépendamment de la mort cellulaire, j'utilise 10 μ M d'ELT sur les lignées cellulaires et 50 μ M pour les échantillons de patient. Pour des réponses plus tardives ou des effets sur la mort cellulaire, je me place à 20 μ M d'ELT pour les lignées cellulaires et 100 μ M pour les échantillons issus de patient LAM.

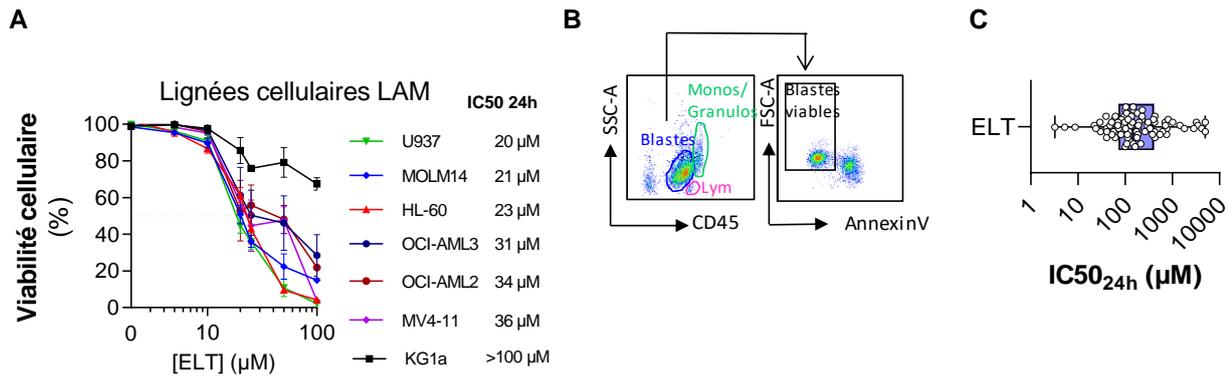


Figure 24: ELT induit de la mort dans les cellules de LAM. (A) Sensibilité à ELT sur 24 h de traitement dans les lignées de LAM. L' IC_{50} est mesurée à partir de la viabilité mesurée par CMF avec le marquage Annexine V (n=3). **(B)** Stratégie de fenêtrage pour l'analyse de la sensibilité dans les échantillons primaires de patient LAM. Les lymphocytes et les monocytes/granulocytes sont exclus des analyses par un fenêtrage en CD45/SSC-A. **(C)** IC_{50} ELT 24 h des échantillons de patients (n=78).

Comme montré ci-dessus, ELT induit une mort cellulaire dans les cellules de LAM. Les événements précoces d'induction des voies de mort cellulaire modifient la fonction mitochondriale. Afin de définir ces événements, j'ai analysé la participation des voies impliquées dans la mort induite par ELT. Pour déterminer celles-ci j'ai effectué dans la lignée MOLM14 des co-traitements d'ELT avec différentes molécules inhibitrices des voies de mort cellulaire (**Figure 25A**). L'inhibiteur de la necroptose (Nec-1) et de la ferroptose (Ferrostatin-1) ne modifient pas la réponse à ELT. En revanche, l'inhibiteur de l'activation des caspases, z-vad-fmk, améliore partiellement la viabilité cellulaire comparée au traitement avec ELT 20 μ M seul. L'ajout de z-vad-fmk diminue partiellement le clivage de PARP induit par ELT (**Figure 25B**). Pour analyser si l'apoptose impliquée dans la mort induite par ELT est mitochondriale, j'ai regardé la présence de protéines pro- ou anti-apoptotiques à la mitochondrie avec des purifications de mitochondries suite à 24 h de traitement avec ELT 10 μ M. Celles-ci indiquent une modification de la localisation des protéines Bcl-2, HK2 et cytochrome c (**Figure 25C**). En réponse à ELT, celles-ci sont diminuées dans la fraction mitochondriale suggérant une ouverture du pore de perméabilité mitochondriale et par conséquent l'induction de l'apoptose. Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et HK2 sont dissociées du pore et le cytochrome c est libéré dans le cytoplasme. L'ensemble de ces résultats permettent de définir qu'ELT induit de la mort cellulaire par apoptose mitochondriale.

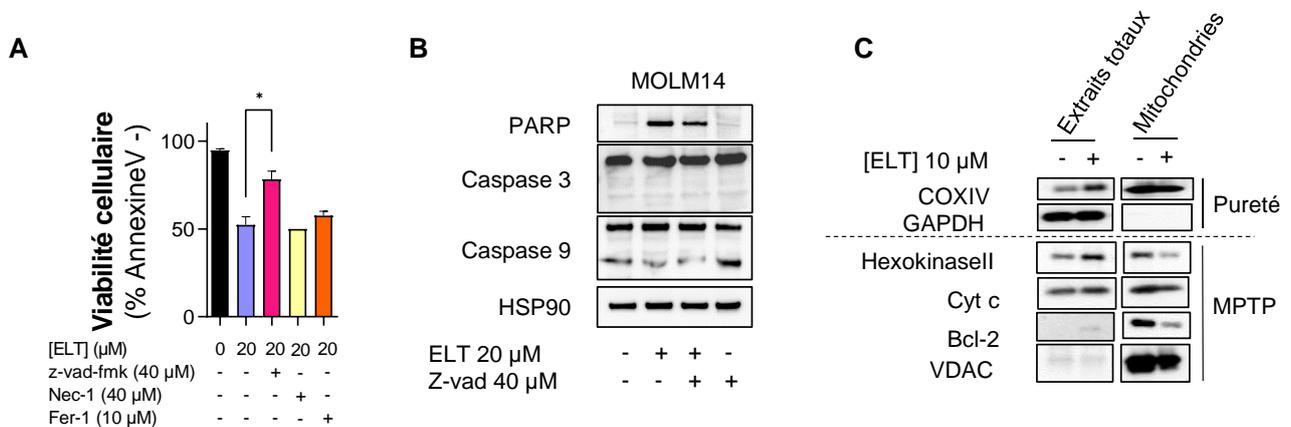


Figure 25: ELT tue les cellules de LAM par induction d'apoptose mitochondriale. (A) Viabilité cellulaire dans la lignée MOLM14 après 24 h de culture avec ELT 20 μM et des chélateurs de voies de mort. z-vad-fmk (n=4), Nec-1 (n=1), Fer-1 (n=2) (Mann&Whitney) (B) Western blot après 24h de traitement avec ELT et z-vad-fmk dans la lignée MOLM14. (C) Analyse de la composition du pore transitoire de perméabilité mitochondrial (MPTP) par purification des mitochondries en réponse à ELT 10 μM 24 h. COXIV et GAPDH valident respectivement la pureté et l'enrichissement des fractions mitochondriales. Les autres protéines sont les composants du pore de perméabilité mitochondriale (MPTP).

Comme l'ELT est un chélateur du fer et que cet ion participe à la réaction de Fenton, cela suppose que cette molécule pourrait impacter la mort cellulaire par ferroptose. J'ai alors mesuré la peroxydation des lipides, marqueur de ferroptose, par CMF avec la sonde C11-bodipy (**Figure 26A**). Il y a une diminution de la fluorescence de la sonde dans le canal FITC (ex/em : 488/525 nm) associée à une diminution de l'oxydation de celle-ci dans les cellules leucémiques de la lignée MOLM14 en réponse à ELT 10 μM . Ainsi, la diminution de la quantité de lipides peroxydés suggère une inhibition de la ferroptose par ELT. Afin de définir si l'inhibition de cette voie de mort cellulaire participe à l'induction de l'apoptose par ELT, j'ai associé cet agent avec une molécule inductrice de la ferroptose. En association avec ELT, l'inducteur de ferroptose RSL-3 a tendance à faire un sauvetage partiel de la mort cellulaire induite par ELT (**Figure 26B**). Ainsi, l'inhibition de la ferroptose par ELT semble participer à l'induction d'apoptose par la molécule.

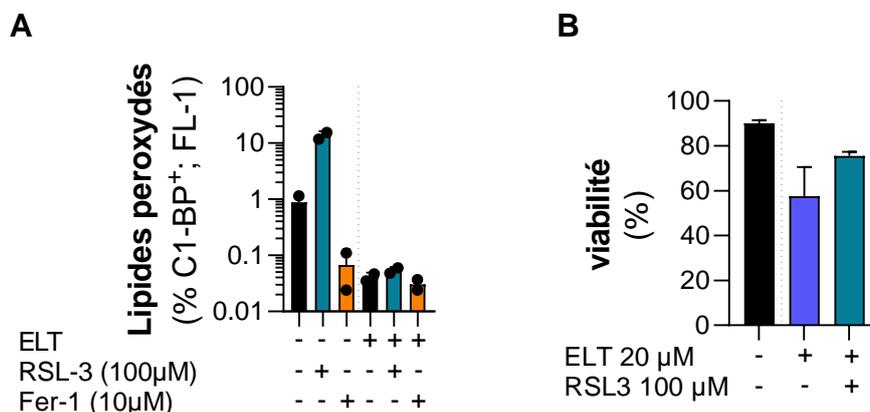


Figure 26: ELT protège de la ferroptose. (A) Peroxydation lipidique mesurée par fluorescence de bodipy-C11 dans les cellules viables en réponse à ELT 10 μM en association avec un inducteur (RSL-3) ou un inhibiteur (Fer-1) de la ferroptose (n=2). (B) Viabilité cellulaire (AnnexineV⁻) de la lignée MOLM14 en réponse à ELT associé à RSL-3 (n=2).

ELT affecte la voie de biosynthèse des Fe-S

ELT est caractérisé pour diminuer le contenu en fer libre cytosolique des cellules entraînant une diminution des ROS et une augmentation des ferritines cytosoliques FTH1 et FTL (**Figure 27A**). Cependant, la chronologie des événements conduisant à la mort cellulaire par ELT n'a jamais été définie, en particulier dans des temps précoces. Nous ignorons si la diminution de la concentration en fer, la diminution des ROS ou encore l'augmentation du CD71 sont précurseurs de la mort induite par ELT ou des conséquences de cette mort cellulaire. La détermination de l'événement déclencheur de la cascade de réponse à ELT permettra de définir plus précisément la séquence de son mécanisme d'action. Pour déterminer celle-ci j'ai réalisé une cinétique de suivi des paramètres de chélation du fer, diminution du stress oxydant, induction du CD71 et induction de la perméabilité membranaire en cytométrie de flux.

Le taux de fer labile est mesuré par la Calcéine-AM en réponse aux chélateurs BIP et PIH montre que dès 30 min post-traitement avec ELT la quantité de ce fer est diminuée et à 1 h post-traitement celle-ci est presque nulle. A 3 h de traitement, la valeur observée était inférieure à 0 validant d'une

part qu'il n'y avait plus de fer cellulaire (ou une concentration inférieure à celle du seuil de détection de la méthode) mais également une chélation par ELT supérieure à celle des inhibiteurs spécifiques du fer permettant de supposer qu'ELT chélate aussi d'autres ions. Les ROS cytosoliques mesurés par DCF-DA sont diminués à 1 h. Après 6 h, il y a l'augmentation du récepteur à la transferrine CD71 (**Figure 27B**). L'augmentation de ce récepteur dont l'ARNm possède une séquence de réponse au fer suggère que suite à la chélation du fer observée 30 min après le traitement, il y a la modulation de la traduction des séquences IRE. Cette augmentation de CD71 est concomitante à une élévation du niveau du taux de fer labile à 6 h. La mort cellulaire intervient entre 6 h et 24 h (significativité : $p=0.032$). Une deuxième cinétique de fluorescence de Calcéine à des temps courts après ajout d'ELT montre que la totalité des ions chélatés par ELT atteint un plateau dès 10 min après ajout de la molécule dans le tube (**Figure 27C**). Ces résultats démontrent que la chélation du fer par ELT est un événement rapide qui précède la diminution des ROS, l'augmentation du CD71 et la mort cellulaire.

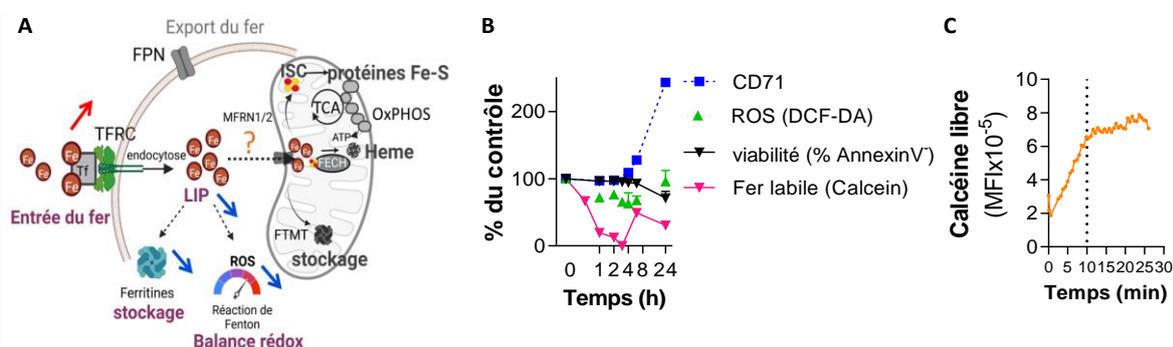


Figure 27: ELT est un chélateur rapide du fer intracellulaire. (A) Schéma représentatif des voies impactées par ELT décrites dans la littérature. (B) Cinétique de réponse à ELT 10 µM mesurée par cytométrie de flux (ratio du non-traité, médianes de fluorescence) : fluorescence intracellulaire de la molécule (ex/em :488/610), CD71 membranaire, ROS mesurés par DCF-DA, viabilité cellulaire mesurée par Annexine V et fer labile mesuré par l'essai Calcéine aux différents temps : 0, 0.5, 1, 2, 4, 6 et 24 h (moyenne de 3 réplicats). (C) Cinétique de chélation de ions après ajout d'ELT 10 µM (médiane de fluorescence de la Calcéine).

ELT chélate le fer cytosolique conduisant à une diminution du fer et des ferritines cytosoliques. Son impact sur l'homéostasie du fer mitochondrial n'est pas caractérisé. J'ai alors analysé son effet sur le contenu en fer mitochondrial. Pour cela, j'ai regardé l'expression des ferritines cytosoliques (FTH1 et FTL) et mitochondriales (FTMT), du transporteur du fer dans les mitochondries puis quantifié le fer libre mitochondrial avec la sonde RPA. L'expression protéique des formes de stockage du fer par western blot après 24 h de traitement de la lignée MOLM14 confirme une diminution, décrite dans la littérature, des ferritines cytosoliques FTH1 et FTL (**Figure 28A**). Ces résultats confortent la régulation des séquences IRE induite par le manque de fer. Cependant, il y a également une diminution de la ferritine mitochondriale FTMT. L'expression de la mitoferrine 1, transporteur du fer dans la mitochondrie, est quant à elle peu affectée. Il semblerait alors que ELT en plus de chélater le fer cytosolique affecte le pool de fer mitochondrial sans impacter la capacité de transport du fer dans cet organe. La quantification du fer mitochondrial, à l'aide de la sonde RPA, montre une diminution du contenu en fer mitochondrial en réponse à ELT dans les cellules MOLM14 et dans 9 échantillons issus de patient LAM traités *ex vivo* (**Figure 28B**). La diminution du fer libre mitochondrial pouvant refléter soit une chélation, soit une augmentation des voies d'utilisation, nous avons fait des analyses d'ironome

par spectroscopie de Mössbauer réalisées en collaboration avec Jean-Marc Latour au CEA de Grenoble. Ces analyses permettent de distinguer la répartition de l'utilisation du fer dans les cellules et avec ELT les motifs Fe-S et hème synthétisés dans les mitochondries ne sont plus détectables (**Figure 28C**). Ces résultats démontrent que ELT diminue également le fer mitochondrial dans les cellules de LAM.

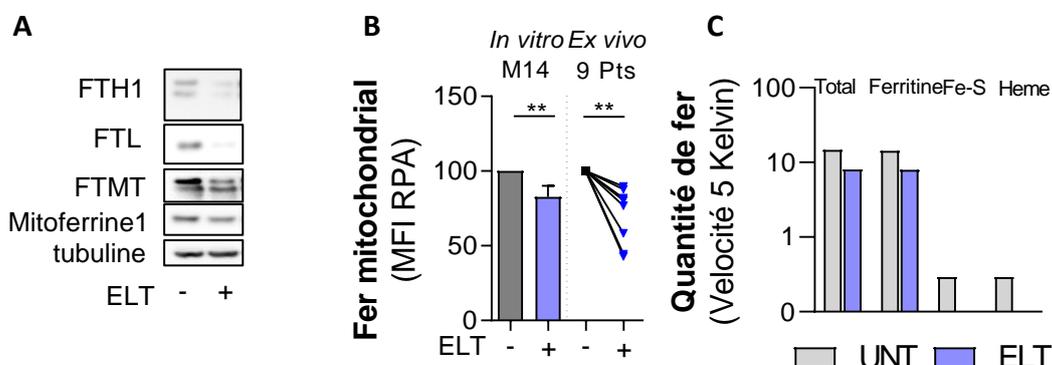


Figure 28: ELT chélate le fer mitochondrial. (A) Expression des ferritines et de MFRN1 dans la lignée MOLM14 en réponse à ELT 10 μ M ; 24 h. (B) Fer mitochondrial dans les blastes viables dans la lignée MOLM14 *in vitro* (médiane de fluorescence, n=5, Mann&Whitney) et *ex vivo* des échantillons primaires de patient LAM (n=9, t-test, pairé). (C) Mesure des formes de fer intracellulaire par spectroscopie de Mössbauer.

Le fer mitochondrial est majoritairement utilisé pour la synthèse d'hème et des motifs Fe-S. J'ai alors souhaité déterminer par western blot et cytométrie si ces voies d'utilisation du fer mitochondrial sont également impactées en réponse à ELT. Dans la lignée cellulaire MOLM14, au niveau de l'expression des enzymes de la voie de biosynthèse des hèmes, les protéines mitochondriales ALAS et FECH sont diminuées après 24 h de traitement avec ELT. Les protéines cytosoliques (UROX et CPOX) sont davantage exprimées. ELT semble alors cibler spécifiquement les enzymes mitochondriales de la voie de biosynthèse des hèmes (**Figure 29A**). L'augmentation du contenu cellulaire en PpIX (**Figure 29B**) et la diminution de l'accumulation de PpIX (**Figure 29C**) suite à l'incorporation d'ALA suggère une perte de l'activité de la FECH concordante avec la diminution d'expression de cette protéine.

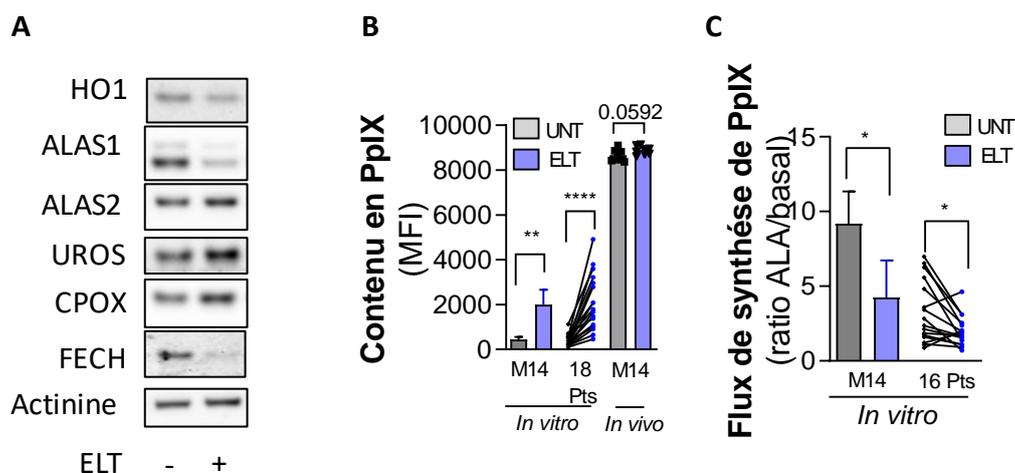


Figure 29: ELT impacte les enzymes mitochondriales de la voie de biosynthèse des hèmes. (A) Expression protéique des enzymes de la voie de biosynthèse de l'hème en réponse à ELT 10 μ M dans la lignée MOLM14. (B) Contenu en PpIX en réponse à ELT mesuré par CMF *in vitro* dans la lignée MOLM14 (n=5, Mann&Whitney), dans des échantillons de patients *ex vivo* (n=18, t-test pairé) ou *in vivo* dans les moelles osseuses d'un CLDX MOLM14 (Mann&Whitney). (C) Flux de synthèse

de PpIX mesuré suite au traitement avec ALA 1 mM pendant 4 h dans la lignée MOLM14 (n=5, Mann&Whitney) et des échantillons de patient *ex vivo* (n=16, t-test pairé).

Pour une meilleure définition des voies impliquées dans la réponse à ELT, des analyses protéomiques ont été réalisées sur la plateforme du pôle technologique du Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (CRCT). J'ai focalisé l'analyse sur les protéines sous-exprimées pour lesquelles le taux de variation est supérieur ou égal à un facteur 2.0 et la valeur de significativité en t-test est inférieure à 0.05 comparé au contrôle non-traité. Les associations des voies sous exprimées (taux de variation ≤ 0.5) sont analysés sur Toppgene (Chen et al., 2009). Cet outil permet d'associer les protéines à des ensembles de voies décrites dans la littérature (*Gene ontology* ; GO). Dans ces analyses réalisées sur les cellules MOLM14 traitées 24 h, les signatures associées à la voie de biosynthèse des hèmes ne sont pas diminuées par ELT (**Figure 30A**). Cependant, il y a une diminution de l'expression des protéines impliquées dans les voies moléculaires liées à la machinerie Fe-S (*metal cluster binding* ; *4 iron, 4 sulfur cluster binding*) et associées à l'activité des protéines Fe-S (*oxydoreductase activity*). La FECH étant une enzyme Fe-S mitochondriale, impliquée dans l'insertion du fer dans les hèmes et impactée par ELT, j'ai regardé l'expression des protéines ISCU, NFS1 et FXN qui participent à cette voie d'utilisation du fer mitochondrial (**Figure 30B**). En réponse à ELT, les expressions protéiques de la FXN et NFS1 sont augmentées tandis que ISCU mitochondrial (ISCU2) est diminué. Les protéines Fe-S telles que MitoNEET et ACO2 sont également moins exprimées avec ELT. L'expression de l'aconitase cytosolique (IRP1) n'est pas modulée par ELT. CISD2, une protéine Fe-S appartenant à la même famille que MitoNEET, est augmentée. L'activité aconitase directement liée à la synthèse des Fe-S est quant à elle fortement impactée par le traitement à ELT 10 μ M (**Figure 30C**).

L'ensemble de ces explorations ont permis de déterminer que ELT cible spécifiquement les enzymes mitochondriales de la voie de biosynthèse des hèmes (FECH et ALAS) augmentant l'expression des enzymes des étapes cytosoliques. L'expression de la protéine ISCU indispensable dans la synthèse des motifs Fe-S est également diminuée conduisant à une perte de l'activité aconitase, enzyme du cycle de Krebs et protéine de réponse au fer.

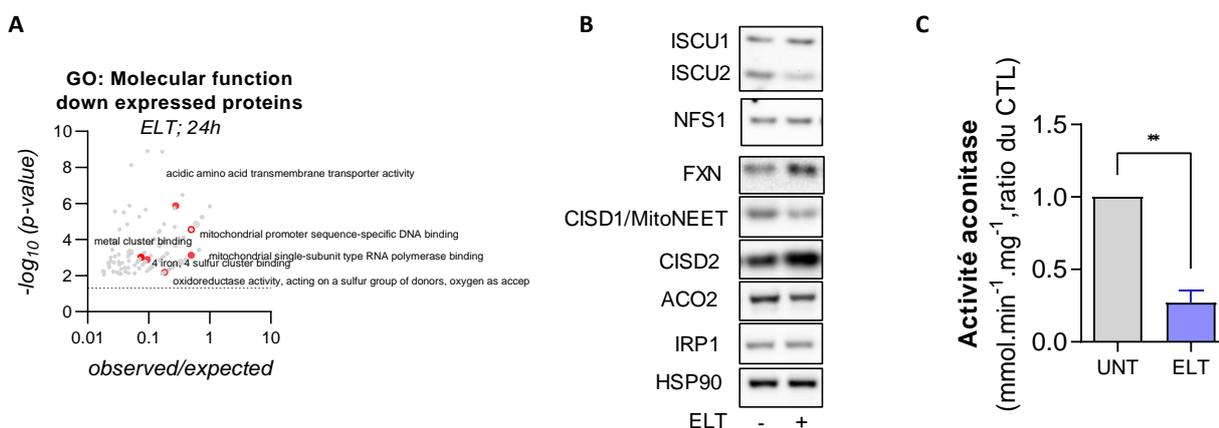


Figure 30: ELT inhibe l'assemblage des motifs Fe-S. (A) Voies associées aux fonctions moléculaires enrichies dans les signatures de sous-expression protéique en réponse à ELT 10 μ M dans la lignée MOLM14. (B) Expression protéique par western blot des protéines impliquées dans l'assemblage et le transfert de Fe-S (ISCU, NFS1, FXN) et Fe-S (CISD1, CISD2, ACO2, IRP1) en réponse à ELT 10 μ M pendant 24 h dans la lignée MOLM14. (C) Activité aconitase en réponse à ELT 10 μ M, 24 h (n=4, Mann&Whitney)

Pour valider les capacités d'ELT dans le traitement des LAM, nous avons ensuite comparé les protéomes obtenus sur cellules MOLM14 traitées 24 h avec ELT 10 μ M aux transcriptomes réalisés sur la lignée HL-60 publiés en réponse à ELT pendant 72 h (Roth et al., 2012). La comparaison des similitudes entre ces deux analyses permet de confirmer des mécanismes communs entre les deux lignées. Je présente ici seulement les résultats des voies sous-exprimées en accord avec le message de la figure. Les associations des voies sous exprimées (taux de variation ≤ 0.5) sont analysés sur Toppgene comme précédemment décrits. Parmi ces analyses, des ensembles de gènes associés à la réponse à des molécules sont analysés. Dans ceux-ci 102 molécules sont communes entre les deux analyses (**Figure 31**). Parmi ces voies communes, nous retrouvons des signatures associées à la réponse à l'AraC et la doxorubicine, 2 molécules utilisés en chimiothérapie intensive dans les LAM. ELT pourrait alors cibler des voies impliquées dans la résistance des cellules de LAM à ces molécules.

Molécules associées aux voies sous exprimées

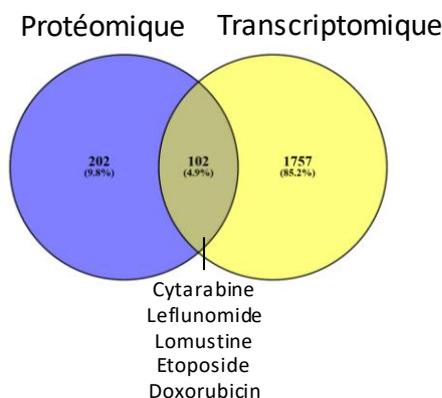


Figure 31: ELT inhibe l'homéostasie du fer mitochondrial dans les cellules de LAM. Diagrammes de Veinn des molécules associées aux protéines et ARN sous exprimés en réponse à ELT.

En conclusion

Bien au-delà de la chélation du fer cytosolique jusqu'ici décrite, ELT chélate le fer mitochondrial et inhibe la synthèse des motifs Fe-S qui inhibe alors l'activité de la FECH et de l'aconitase respectivement impliquées dans la voie de biosynthèse de l'hème et le cycle de Krebs. L'absence de Fe-S dans l'aconitase 1 (ou IRP1) conduit alors à un mécanisme de compensation avec la régulation des protéines de l'homéostasie du fer contenant une séquence IRE. L'ensemble de cette réponse induit une ouverture du pore de perméabilité mitochondriale et à la mort cellulaire par apoptose. En revanche, la chélation du fer permet une protection contre la ferroptose. L'ensemble de ces mécanismes affecte des voies communes avec la réponse à l'AraC. Le métabolisme du fer mitochondrial pourrait participer à la résistance des cellules à cet anti-métabolite.

Partie 2 – Le fer mitochondrial est impliqué dans la résistance à l'AraC

Le fer participe à la résistance à l'AraC

Comme suggéré dans nos travaux ci-dessus, le fer pourrait participer à la résistance à l'AraC et ELT pourrait cibler ces mécanismes de résistance à cette molécule. Ainsi, pour tester cette hypothèse, nous avons dans un premier temps analysé la participation du fer dans la résistance à l'AraC. Pour cela, les cellules de la lignée U937 sensibles à l'AraC sont traitées avec du fer exogène par ajout de chlorure d'ammonium ferrique (FAC) à 10 mg/mL (**Figure 32A**). L'ajout de FAC en combinaison à l'AraC restaure la viabilité cellulaire mesurée par marquage à l'Annexine V, marqueur de l'externalisation des phosphatidylsérines. Suite au traitement avec AraC il reste 48.7% de cellules viables alors qu'en combinaison avec la FAC, 61.6% de cellules sont viables. Associé à cette perte de marquage Annexine V, le clivage de PARP, une protéine apoptotique survenant lorsque l'ADN est endommagé suite à un stress génotoxique, est diminué par la combinaison (**Figure 32B**). Le fer semble alors impliqué dans la résistance à l'AraC *in vitro*.

Le fer module la traduction des ARNm possédant une séquence IRE. Ainsi l'expression de ces protéines permet de déterminer indirectement le contenu en fer cellulaire. Pour estimer l'effet potentiel d'AraC sur le contenu en fer cellulaire, j'ai regardé leur modulation dans les cellules résiduelles après traitement à l'AraC. Pour cela, j'ai utilisé la cytométrie qui permet d'exclure les cellules mortes de l'analyse. L'AraC module l'expression du CD71 membranaire (**Figure 32C**) et de la ferritine FTH1, protéines régulées par la traduction IRP/IRE, dans les blastes résistants à l'AraC (**Figure 32D**). Dans des cellules de patient traitées *ex vivo*, le récepteur à la transferrine diminue. L'ARNm de ce transporteur possède une séquence 3'IRE dont l'ARN est dégradé en présence d'un niveau élevé de fer. En effet, les cellules résiduelles après traitement à l'AraC *ex vivo* ou *in vivo* augmentent leur contenu en FTH1 intracellulaire. Ainsi ces résultats montrent que les blastes résistants à l'AraC possèdent un taux de fer intracellulaire élevé.

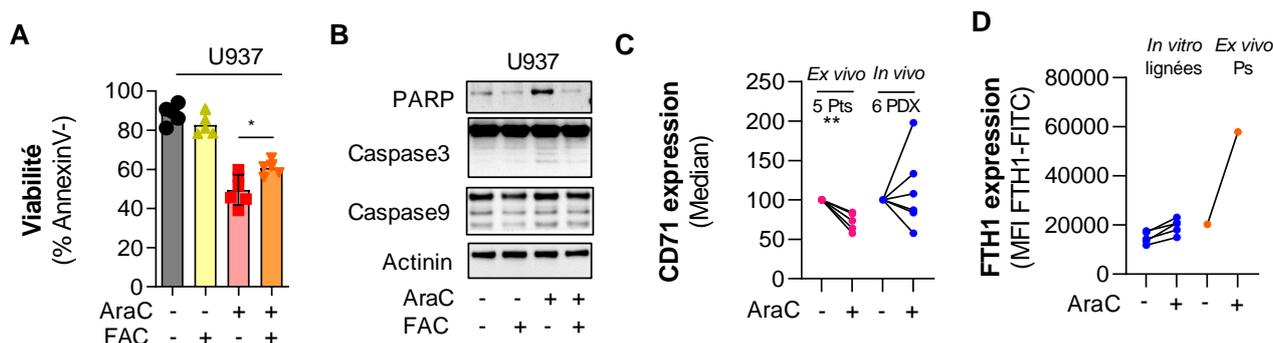


Figure 32: Le fer cellulaire participe à la résistance à l'AraC. (A) Viabilité cellulaire mesurée par un marquage en annexine V dans la lignée U937 traitée avec AraC et ou FAC pendant 24 h (n=5, Mann&Whitney) (B) Western blot apoptose dans la lignée U937 en réponse à AraC et FAC 24 h. (C) Expression de CD71 par CMF dans les blastes viables en réponse à l'AraC sur des cellules de patient traitées 24 h *ex vivo* (n=5 ; t-test païré ; MFI, médiane normalisée au non-traité) et des moelles osseuses de PDX après 5 jours de traitement à l'AraC 60 mg.kg⁻¹ (n=6, t-test païré ; MFI, médiane normalisée au non-traité) (D) Expression de FTH1 par CMF dans les blastes viables en réponse à l'AraC sur des cellules de patient traitées 24 h *ex vivo* (n=5 ; t-test païré) et des moelles osseuses de PDX après 5 jours de traitement avec AraC 60 mg.kg⁻¹ (n=1).

Ces observations sont confirmées par des colorations de Perl's réalisées sur la plateforme d'histologie de Purpan (UMS006, Toulouse) sur les sternums de souris xénotreffées et traitées à l'AraC 30

mg.kg⁻¹ ou son véhicule (PBS) pendant 5 jours. Ces colorations histologiques montrent une augmentation de la coloration bleue dans les moelles osseuses de souris traitées à l'AraC de 2 PDX indépendants, IM90 et IM06 (**Figure 33A**). Cela indique une augmentation de fer ferrique (Fe³⁺) dans ces espaces. Ces données suggèrent un rôle de l'homéostasie du fer dans la résistance des cellules de LAM à l'AraC. La coloration violette en HE liée à la coloration des noyaux par l'hématoxyline, indique la présence de nombreuses cellules dans les moelles des souris non-traitées (**Figure 33B**). Les moelles osseuses sont envahies de blastes. En réponse à l'AraC, il y a une forte diminution des cellules présentes dans les moelles osseuses. De façon intéressante, le PDX injecté avec le patient IM76 répond moins bien à l'AraC (diminution en HE plus faible) mais possède déjà des cellules Perl's positives en basal. Une augmentation de la coloration de Perl's est un marqueur des anémies sidéroblastiques et est liée à une accumulation de fer mitochondrial causée par un défaut d'utilisation de celui-ci liée à des mutations dans les voies de biosynthèse de l'hème, des Fe-S ou du métabolisme mitochondrial (Cazzola et al., 2003; Ducamp and Fleming, 2019).

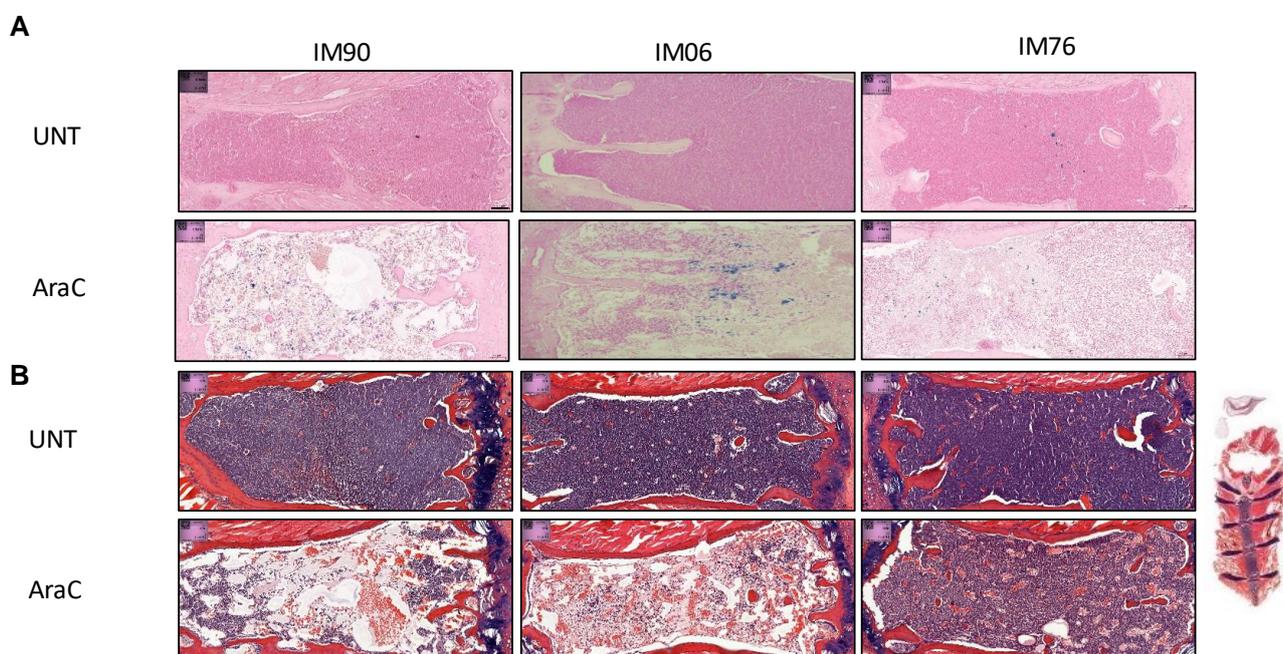


Figure 33: AraC augmente le fer dans les moelles osseuses de PDXs de LAM. (A) Colorations histologiques de Perl's et (B) HE dans les sternums de souris non traitée ou traitée à l'AraC 30 mg/kg pendant 5 jours. Sur la droite le scan du sternum entier (non traité, IM90), dont sont issues les images en HE.

Le fer pouvant être transporté dans les mitochondries et la coloration de Perl's augmentée en réponse à l'AraC oriente vers une modification de l'utilisation du fer lors du traitement avec AraC. Cet ion pouvant être transporté dans les mitochondries, j'ai regardé sa présence dans ces organites. Les cellules de la lignée MOLM14 traitées 24 h à l'AraC 2 μ M augmentent leur expression de ferritines FTH1 et FTL (**Figure 34A**) confirmant les résultats précédents qui suggéraient la régulation des protéines de réponse au fer CD71 et FTH1. L'AraC augmente également l'expression de FTMT, l'isoforme mitochondriale de la ferritine ainsi que la MFRN1, transporteur du fer dans les mitochondries. Ainsi, les cellules résiduelles après AraC semblent augmenter leur teneur en fer mitochondrial. La quantification du fer mitochondrial par la sonde RPA dans les blastes résiduels après traitement à l'AraC *in vitro* et *in vivo* montrent que l'AraC augmente le contenu en fer mitochondrial dans les cellules résiduelles post-AraC (**Figure 34B**).

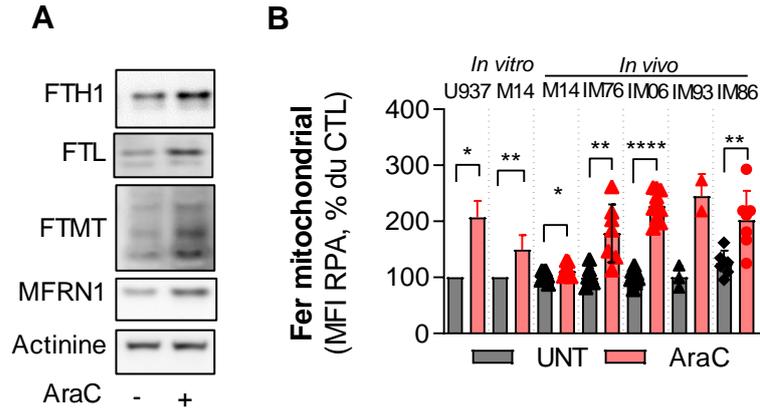


Figure 34: Le fer mitochondrial est augmenté dans les cellules persistantes à l'AraC. (A) Expression des ferritines et de MFRN1 en réponse à l'AraC 2 μ M 24 h dans la lignée MOLM14 **(B)** Fer mitochondrial dans les blastes résiduels de PDX traités à l'AraC 30 mg.kg⁻¹ pendant 5 jours (Mann & Whitney).

Ces résultats ont permis de montrer que les cellules persistantes à l'AraC augmentent leur contenu en fer. Ces cellules possèdent une capacité accrue de transport du fer dans les mitochondries permettant d'augmenter la concentration en fer mitochondrial.

La voie de biosynthèse des hèmes et des Fe-S participe à la résistance à l'AraC

L'AraC augmentant le fer mitochondrial dans les cellules résiduelles, j'ai ensuite étudié les voies d'utilisation du fer mitochondrial en réponse à cette anthracycline afin de déterminer si son accumulation est liée à un défaut ou à une augmentation d'utilisation de ce fer dans des voies de synthèse des hèmes et des motifs Fe-S. Le traitement *in vitro* de la lignée MOLM14 à l'AraC, permet également d'augmenter l'ensemble des enzymes de la voie de biosynthèse de l'hème (**Figure 35A**). L'expression des protéines HO-1, ALAS1, UROS, UROD et FECH est augmentée en réponse à l'AraC. L'ensemble de la voie de biosynthèse de l'hème semble donc davantage activée dans les cellules résistantes à l'AraC. Cette observation est confirmée en cytométrie de flux par une augmentation du contenu en PpIX, intermédiaire de la voie de biosynthèse de l'hème, *in vitro* et *in vivo* (**Figure 35B**). Ces résultats suggèrent que les cellules résiduelles augmentent leur biosynthèse d'hème et par conséquent l'usage du fer dans cette voie.

La contribution de la voie de l'hème dans la réponse à l'AraC est déterminée par des stimulation (ALA) ou des inhibitions des enzymes de la voie de biosynthèse (**Figure 35C**). Un co-traitement de la lignée sensible U937 avec le précurseur de la voie de biosynthèse de l'hème ALA, permet de restaurer la viabilité cellulaire de 49.1% à 60.7 % (**Figure 35D**). Cette voie d'utilisation du fer mitochondrial pour la biosynthèse de l'hème semble donc participer à la résistance des cellules à l'AraC. L'inhibition de différentes étapes de la biosynthèse de l'hème permet de déterminer leur contribution dans la résistance : i. Une des premières enzymes de la voie, ALAD, inhibée avec la Succinylacétone (SA), ne modifie pas la réponse à l'AraC de la lignée MOLM14 (**Figure 35E**) ; ii. L'inhibition de la FECH, enzyme mitochondriale qui permet l'insertion du fer dans l'hème, par la NMM (**Figure 35F**) ou des ciblage génétiques par interférence d'ARN (siRNA) sensibilise la lignée MOLM14 à l'AraC (**Figures 35G, 35H**). Nos données indiquent que la FECH, seule enzyme Fe-S de la voie de biosynthèse de l'hème, participe à la résistance à l'AraC des cellules leucémiques. Celle-ci pourrait refléter une dépendance des cellules résistantes à l'assemblage des Fe-S.

La régulation de l'assemblage des Fe-S et de l'expression de différentes enzymes Fe-S est regardée en réponse à l'AraC dans l'objectif de voir la contribution de cette voie dans la résistance à l'AraC. Les protéines de transfert et d'assemblage des Fe-S ISCU2 et la cystéine désulfurase NFS1 sont davantage exprimées en réponse à l'AraC 2 μM (**Figure 35I**). Cependant AraC diminue l'expression de la FXN. Associé à ces modifications, il y a une augmentation de l'expression des différentes enzymes Fe-S (CISD1, CISD2, ACO2, IRP1). L'activité aconitase associée à l'insertion des Fe-S dans les protéines est augmentée en réponse à AraC confirmant une machinerie de synthèse plus active qui pourrait participer à la résistance à l'AraC et à l'augmentation de la voie de biosynthèse des hèmes (**Figure 35J**).

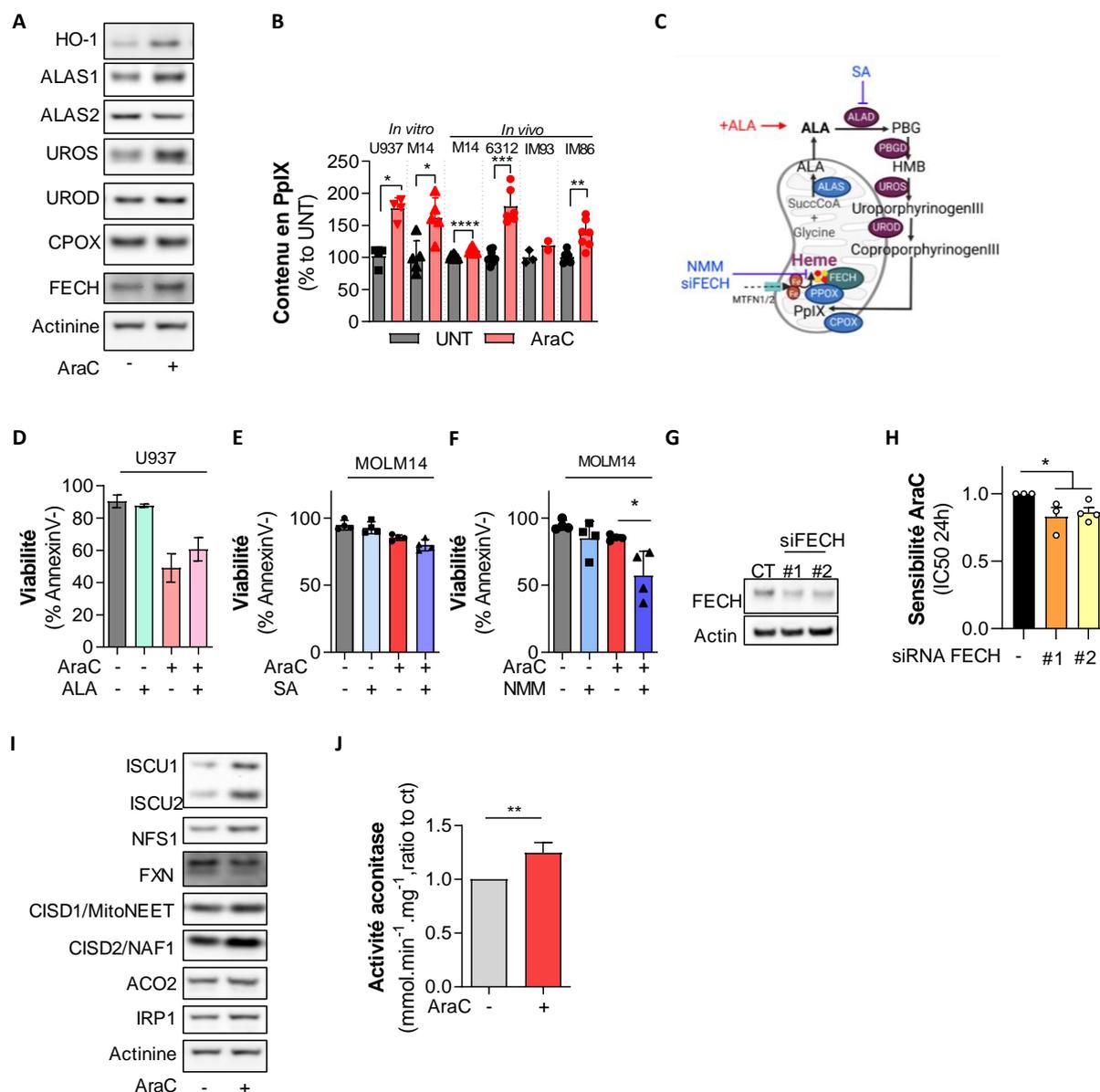


Figure 35: La biosynthèse des hèmes et des Fe-S participe à la résistance à l'AraC. (A) Expression par western blot des enzymes de la voie de biosynthèse des hèmes dans la lignée MOLM14 traitée 24 h à l'AraC 2 μM (B) Fluorescence de la PpIX dans les cellules résiduelles post-AraC *in vivo* suivant 5 jours de traitement à 30 mg.kg⁻¹ dans les moelles osseuses (Mann&Whitney) (C) Schéma de la modulation de la voie de biosynthèse de l'hème par les activateurs (en rouge) et les inhibiteurs (en bleu). (D) Sensibilité 24 h de la lignée U937 avec ALA 1 mM et AraC 2 μM (n=2) (E) Viabilité cellulaire en réponse à AraC et succinylacétone (SA) 0.2 mM (n=4, Mann&Whitney non-significatif) (F) ou la NMM 10 μM (n=4 ,

Mann&Whitney) **(G)** Validation de l'invalidation de la FECH par les siRNA après 48 h de transduction **(H)** IC₅₀ 24 h en réponse à l'AraC de la lignée MOLM14 avec siRNA FECH (Mann&Whitney) **(I)** Western blot de l'expression protéique des protéines Fe-S et **(J)** Activité aconitase de la lignée MOLM14 en réponse à l'AraC 2 µM (n=4, Mann&Whitney)

En conclusion

Les cellules persistantes à l'AraC augmentent leur contenu en fer. Ce fer participe à l'augmentation du stockage du fer par les ferritines et à l'augmentation du fer mitochondrial. Le fer mitochondrial permet de soutenir les voies de biosynthèse des hèmes et des motifs Fe-S accrues. La FECH qui est surexprimée, participe à la survie des cellules en réponse à l'AraC suggérant que la voie de synthèse des Fe-S est indispensable à la résistance des cellules.

Partie 3 : ELT inhibe la fonction OxPHOS et restaure la sensibilité à l'AraC des cellules de LAM.

La chélation du fer mitochondrial avec ELT modifie le métabolisme cellulaire

Les protéines Fe-S sont impliquées dans le métabolisme cellulaire et mitochondrial. En particulier, elles participent au transfert des électrons indispensable à l'activité de la chaîne de transport des électrons. Une chélation de la biosynthèse des Fe-S suggère une altération du métabolisme mitochondrial impliqué dans la résistance à l'AraC des cellules de LAM. De même, la diminution des protéines associées à la réponse au léflunomide, inhibiteur de la DHODH, observée dans les données protéomiques suppose également qu'ELT pourrait cibler le métabolisme des pyrimidines et perturber le transfert d'électrons de la chaîne respiratoire (**Figure 31**).

Pour valider l'impact d'ELT sur l'activité de la chaîne respiratoire, j'ai mesuré la participation de la glycolyse et de la mitochondrie dans la production d'ATP (**Figure 36A**). La production d'ATP est davantage glycolytique montrant un shift énergétique appelé effet Pasteur et observé également en réponse à des OxPHOSi comme la roténone, l'antimycine A, l'oligomycine ou la metformine. Ces observations sont soutenues par une augmentation de la consommation de glucose et de production de lactate traduisant une glycolyse plus importante (**Figure 36C**). L'analyse métabolomique des intermédiaires de la glycolyse en spectrométrie de masse de type LC-MS, montre qu'il y a une augmentation de la concentration intracellulaire des premiers métabolites de cette voie métabolique : fructose-6-phosphate (Fru6P) et glucose-3-phosphate (glc3P) (**Figure 36B**). Les intermédiaires suivants, Fructose bisphosphate et α -KG, ne sont pas augmentés supposant une sortie au niveau du Fru6P vers la voie des pentoses phosphates (**Figure 36B, 36D**). Cette voie liée à la glycolyse soutient la synthèse des nucléotides. Ces résultats pourraient suggérer une glycolyse incomplète. Cependant, une augmentation de la production de lactate traduit l'étape finale de la glycolyse (**Figure 36C**). Le 2,3-phosphoglycérate (2-3PG) est aussi légèrement diminué. Même si cette diminution est faible, elle est significative. Or la production de formate significative suggère qu'une part du 2,3-PG est redirigé dans la voie de synthèse de la sérine qui peut alors être métabolisée en glutathion et formate. L'augmentation de la production de formate dans le milieu extracellulaire en RMN confirme ces observations. Ainsi nous pouvons conclure que les cellules traitées avec ELT augmentent leur glycolyse. La consommation de glucose sert à alimenter à la fois la synthèse des nucléotides *via* la voie des pentoses phosphates et la voie de la sérine mais également à approvisionner la voie de synthèse des hèmes par l'intermédiaire de la glycine.

Enfin, le pyruvate, produit final de la glycolyse peut alors alimenter le cycle de Krebs indispensable à la chaîne de transport des électrons. Au niveau de cette voie métabolique, les premiers intermédiaires de la voie sont augmentés en réponse à ELT (**Figure 36B, 36D**). En effet, le citrate/isocitrate et le cis-aconitate (cis-aco) sont fortement augmentés dans les cellules MOLM14 traitées par ELT. Cependant, au niveau des étapes suivantes, il n'y a pas de différence de concentration des métabolites. Ceci suggère alors une sortie du cycle de Krebs au niveau de l' α -KG pour alimenter la voie de biosynthèse des lipides ou la voie du mévalonate qui participe à la synthèse du cholestérol, des hèmes et de l'ubiquinone. De façon intéressante, l'augmentation légère de la consommation de glutamine avec l'augmentation de succinate pourrait supposer une légère augmentation de la glutaminolyse.

Ainsi l'ensemble de ces résultats démontrent qu'ELT induit une reprogrammation métabolique en faveur de la glycolyse. Nous observons une augmentation des premiers intermédiaires du cycle de Krebs avec une accumulation de succinate non-significative (**Figure 36B, 36D**) qui pourrait refléter un blocage de ce cycle au niveau de l'activité de la SDH et ainsi une altération de la fonction OxPHOS des cellules. Les sorties de ces voies métaboliques, au niveau du 2,3-PG pour la glycolyse et de l' α -KG pour le cycle de Krebs pourrait aussi par l'intermédiaire de la glycine participer à la voie de synthèse des hèmes et par conséquent refléter une adaptation pour compenser le stress de l'inhibition de cette voie par ELT.

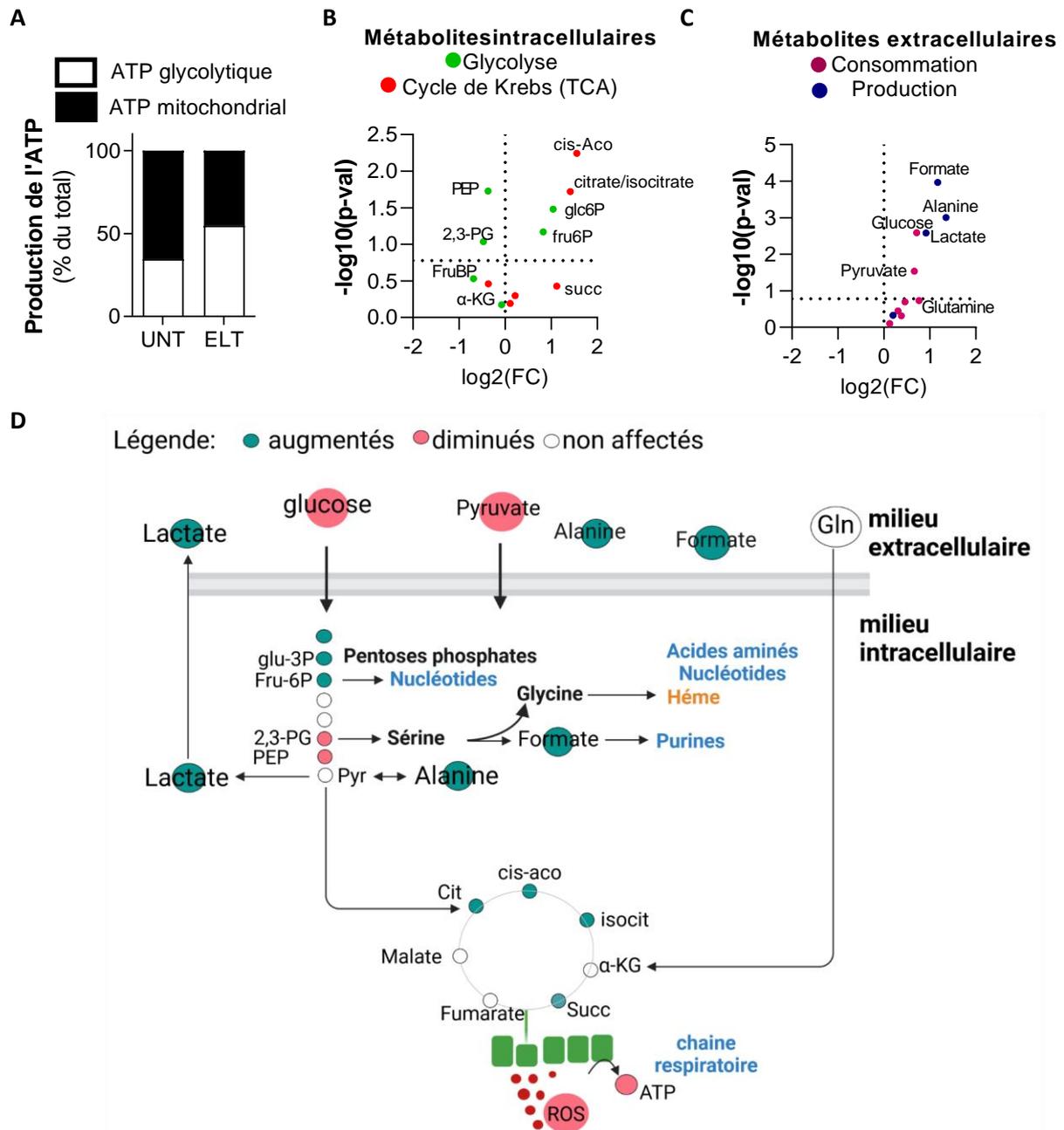


Figure 36: ELT affecte le métabolisme énergétique des cellules de LAM. (A) Répartition des sites de production de l'ATP de la lignée KG1a en réponse à ELT 10 μ M (moyenne, n=3). (B) Quantification des métabolites intracellulaires par LC-MS (n=3, t-test) et (C) Consommations et productions de métabolites dans le milieu extracellulaire mesurés par RMN en réponse de la lignée MOLM14 à ELT 10 μ M 24 h (n=3, t-test) (D) Schéma bilan de l'activité d'ELT sur le métabolisme cellulaire.

Chélater le fer mitochondrial avec ELT inhibe l'augmentation de la fonction OxPHOS par AraC

Comme précédemment publié, les cellules persistantes à l'AraC ont un métabolisme mitochondrial élevé. J'ai alors montré avec les résultats précédents qu'ELT reprogramme le métabolisme cellulaire. Ainsi, diminuer le contenu en fer mitochondrial avec ELT pourrait affecter cette voie de résistance (Bosc et al., 2021, 2020; Farge et al., 2017; Stuani et al., 2019). J'ai alors étudié la modulation des activités énergétiques en combinaison avec AraC.

J'ai dans un premier temps regardé si ELT affecte la synthèse des mitochondries. L'expression de TFAM, facteur de transcription de l'ADN mitochondrial est légèrement diminuée avec ELT. L'expression de PGC1 α , facteur de transcription de nombreux gènes impliqués dans l'activité mitochondriale, n'est pas modifiée dans la lignée MOLM14 traitée 24h avec ELT (**Figure 37A**). De même, ELT induit une légère diminution de la masse mitochondriale dans les cellules montrant un défaut de biogénèse mitochondriale (**Figure 37B**). En combinaison avec AraC, les cellules ne parviennent plus à augmenter l'expression de protéines TFAM, PGC1 α et la masse mitochondriale observées avec le traitement AraC seul.

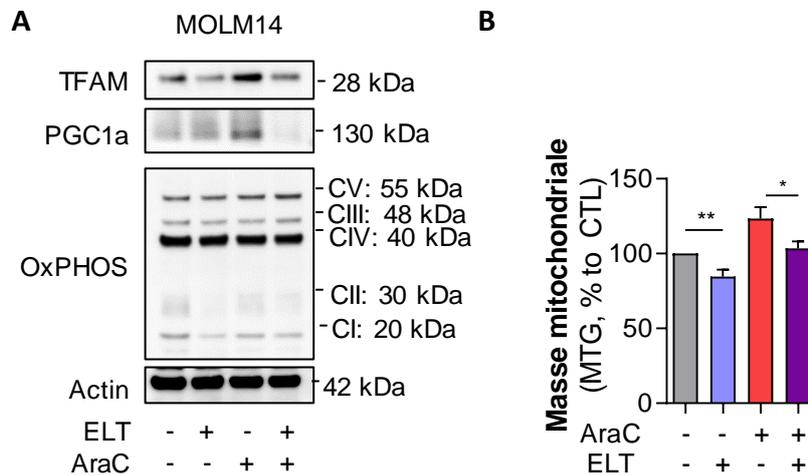


Figure 37: ELT affecte la biogénèse mitochondriale. (A) Western blot de la lignée MOLM14 en réponse à ELT 10 μ M et AraC 2 μ M, 24 h. Les protéines associées sont notées sur la figure. (B) Masse mitochondriale mesurée par CMF avec le MTG (n=5, Mann&Whitney)

J'ai ensuite étudié l'activité de ces mitochondries. L'altération des mitochondries conduit à une diminution de la respiration cellulaire mesurée par seahorse (**Figure 38A**). En particulier, même si les cellules maintiennent celle-ci avec ELT seul, l'AraC ne parvient plus à augmenter celle-ci. ELT diminue l'expression des complexes I et II de la chaîne de transfert des électrons (OxPHOS) sans modifier l'expression des sous-unités des complexes III, IV et V (**Figure 37A**). En effet, la molécule inhibe les activités enzymatiques de ces deux complexes même en présence d'AraC (**Figure 38B, 38C**). Nous observons également que l'activité de l'aconitase, enzyme du cycle de Krebs, est fortement impactée avec la combinaison AraC/ELT (**Figure 38D**). Ces analyses permettent de démontrer qu'ELT cible l'activité des complexes I et II et de l'aconitase indispensables pour maintenir l'activité OxPHOS des cellules résistantes à l'AraC. J'ai confirmé ces résultats dans les blastes de patients traités *ex vivo* avec AraC, l'analyse du métabolisme grâce à la technologie Scénith montre une tendance des blastes à l'augmentation de la dépendance mitochondriale (**Figure 38E**). De même, il y a une augmentation

non-significative de la capacité à utiliser l'oxydation de acides gras et des acides aminés pour compenser l'inhibition de la glycolyse par le 2-DG (capacité FAO/AAO) (**Figure 38F**). Ces données reflètent la capacité OxPHOS élevée des blastes leucémiques suite à un traitement à l'AraC mais également leur flexibilité métabolique pour répondre à un stress. En réponse à ELT, les cellules ont à l'inverse une tendance à la diminution de ces paramètres qui reflètent les capacités mitochondriales. La molécule ELT en combinaison avec AraC semble diminuer la capacité des cellules, lors de l'inhibition de la glycolyse, à basculer sur la β -oxydation ou l'oxydation des acides aminés.

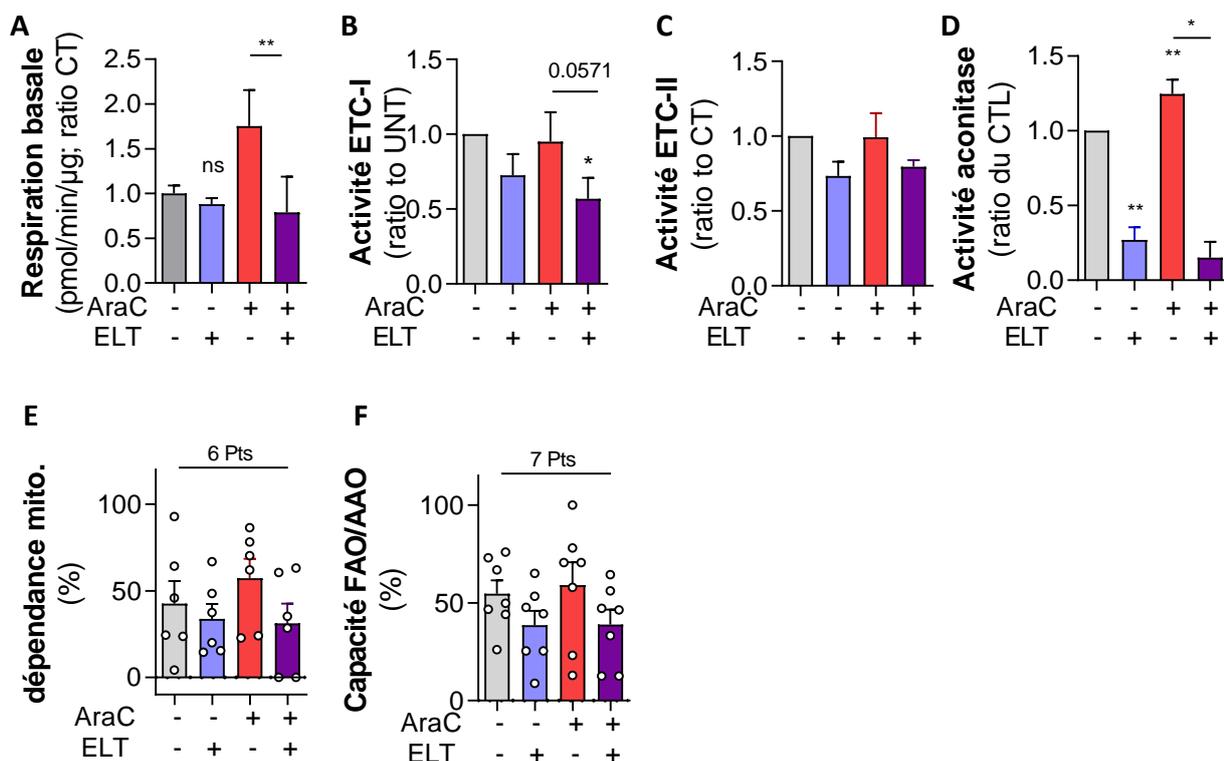


Figure 38: La chélation du fer mitochondrial par ELT bloque l'adaptation métabolique en réponse à l'AraC. (A) Respiration basale en Seahorse (n=5, Mann&Whitney), (B) Activité enzymatique ETC-I (n=3), (C) ETC-II (n=2), (D) Aconitase (n=4, Mann&Whitney). (E) Dépendance mitochondriale (n=6, t-test païré non-significatif) et (F) capacité FAO/AAO mesurée en Scénith dans des échantillons de patients LAM en réponse à ELT 50 μ M et AraC 25 μ M *ex vivo*, 24h (n=7, t-test païré non-significatif)

L'ensemble de ces résultats montre que ELT affecte la biogénèse mitochondriale et l'activité des complexes I et II nécessaires au transfert de protons vers le complexes III par l'intermédiaire de l'ubiquinone. Ces dysfonctionnements associés à une altération de l'aconitase dans le cycle de Krebs ne permettent plus aux cellules d'augmenter leur fonction oxydative en réponse à l'AraC pouvant permettre alors d'éradiquer les cellules persistantes à cette molécule.

ELT sensibilise à l'AraC mais pas à l'Ida

Dans l'objectif d'étudier le potentiel de combinaison et les meilleurs associations d'ELT dans le traitement des LAM, la capacité d'ELT à améliorer l'efficacité des chimiothérapies conventionnelles est analysée *in vitro*. Les indices de combinaison (Ci) des combinaisons d'ELT avec AraC ou Ida 24 h sont calculés par la méthode de Choux et Talalay avec le logiciel Compusyn à partir des matrices de viabilité (**Figure 39A, 39B**). Lorsque l'indice est inférieur à 1, l'effet entre les molécules est synergique alors que s'il est supérieur à 1 l'effet entre les molécules est antagoniste. Dans la lignée MOLM14 la

combinaison AraC/ELT est synergique alors qu'avec l'Ida nous observons un effet antagoniste (**Figure 39C**). Seulement l'association avec AraC sera alors explorée dans la suite de l'étude.

La capacité d'ELT à améliorer la réponse à l'AraC est validée dans des échantillons de patient traités *ex vivo*. Les PBMCs issus de patients sont traités avec AraC 25 μM et ELT 50 μM pendant 24 h (**Figure 39D**). La viabilité des cellules dans chaque condition est analysée dans les blastes exprimant CD45 avec un marquage Annexine V. Nous observons une diminution de la viabilité cellulaire après traitement avec la combinaison AraC/ELT (57.3 % de viabilité) comparé aux molécules seules (respectivement 74.5 et 76.2 %) (**Figure 39E**).

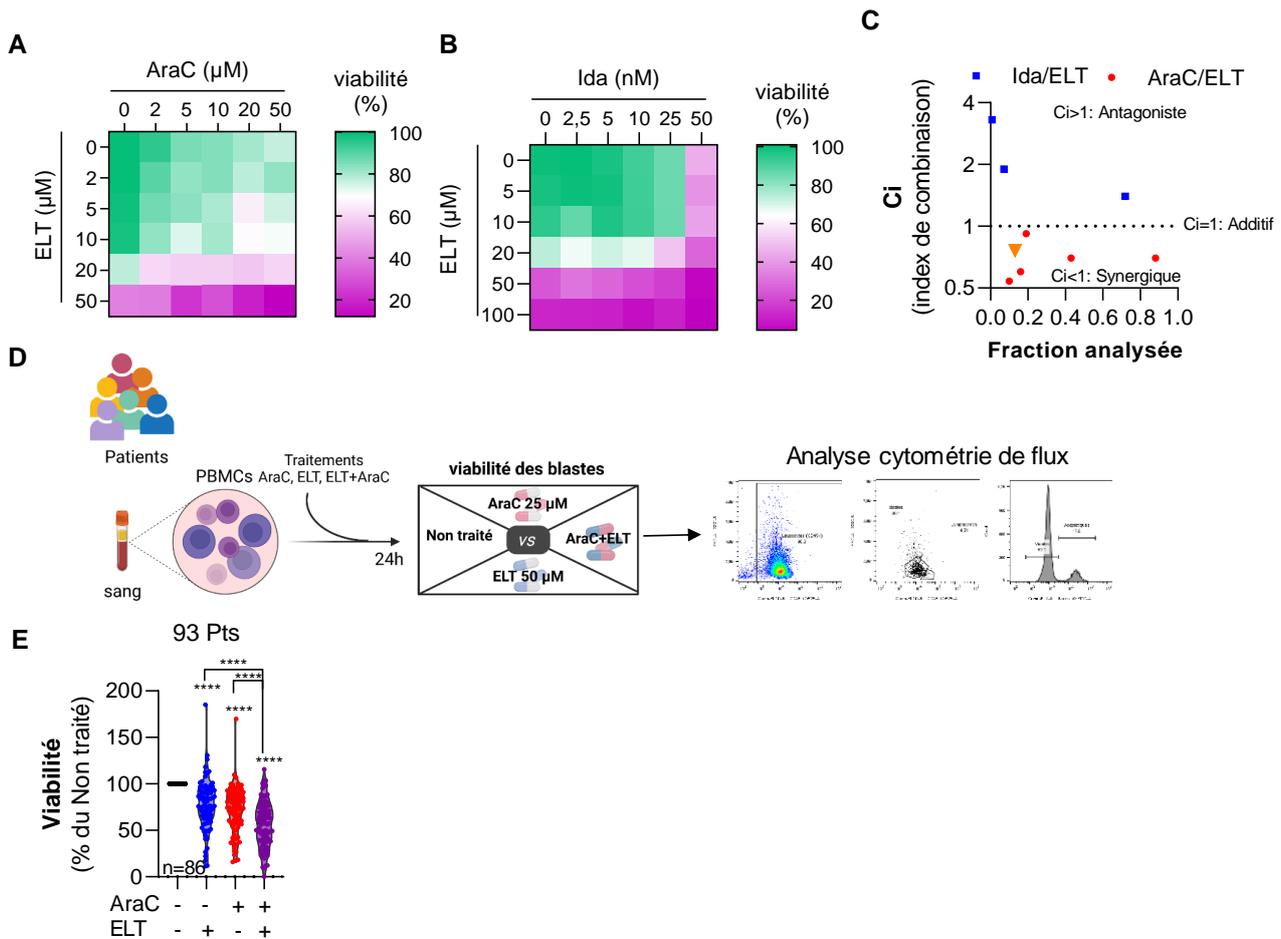


Figure 39: ELT synergise avec AraC mais pas avec Ida. (A) Matrice de viabilité de la lignée MOLM14 en réponse à ELT en combinaison avec AraC ou (B) Ida (moyennes de 3 réplicats). (C) Indices de combinaison (C_i) de ces combinaisons mesurées par la méthode de Chou et Talalay avec des ratio 1:1 entre les drogues. (D) Design d'analyse de la combinaison AraC/ELT sur les échantillons primaires de patients. Les PBMCs issus du sang sont ensemencés avec les drogues pendant 24 h puis la viabilité analysée par CMF avec un marquage CD45 et Annexine V. (E) viabilité des échantillons primaires (n=93, Mann&Whitney).

Le microenvironnement pouvant influencer la réponse aux traitements, j'ai testé la combinaison AraC/ELT dans des conditions physiologiques avec des modèles murins de xéno greffe en souris NSG (**Figure 40A**). La fluorescence de la molécule est utilisée pour déterminer la concentration d'ELT dans les sérums suite au schéma complet de traitement de 5 jours à 50, 100 et 150 $\text{mg.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$ (**Figure 40B**). La concentration sérique atteint 400 μM avec 100 mg.kg^{-1} , dose utilisée par la suite. Dans un CLDX résistant à l'AraC (MOLM14) et 2 PDX indépendants (IM90 et IM76) nous observons une diminution du nombre de blastes dans la moelle osseuse et la rate des animaux après traitement

avec la combinaison comparé à AraC seul (**Figure 40C**). Ces résultats sont associés à une augmentation du pourcentage des blastes en apoptose présents dans les moelles osseuses (**Figure 40D**). Le PDX IM06 n'a pas répondu à la combinaison. Cependant, il répond très bien à l'AraC seul avec une réduction de 50 fois du nombre de blastes en réponse à l'AraC 30 mg.kg⁻¹.

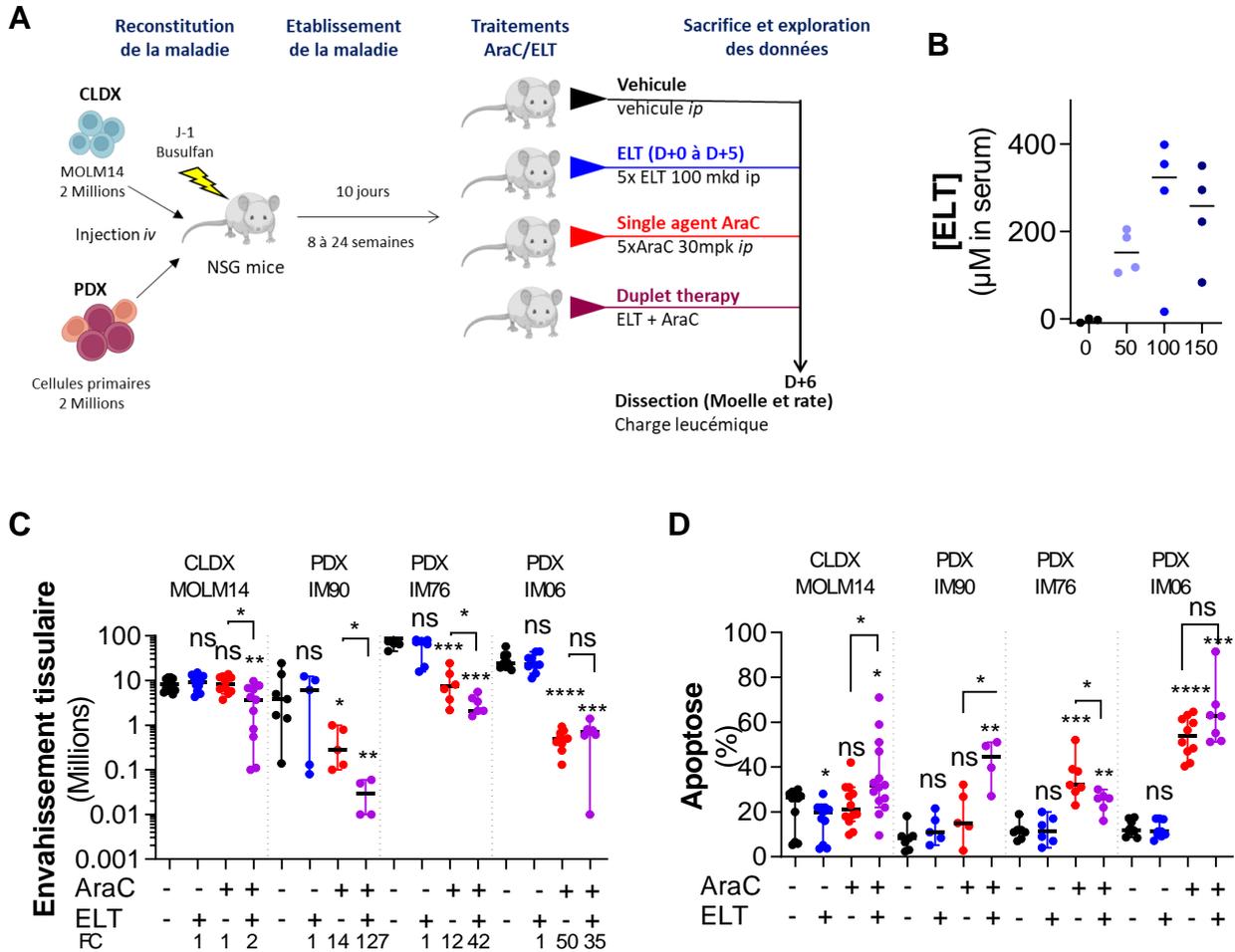


Figure 40: ELT potentialise la réponse à l'AraC in vivo. (A) Design d'étude de la sensibilité entre AraC et ELT in vivo. (B) dosage sérique d'ELT dans les sérums des souris traitées à ELT 0, 50, 100 et 150 mg.kg⁻¹ pendant 5 jours. (C) Nombre de blastes CD45 humains et (D) Apoptose dans les rates et moelle osseuses des souris traitées 5 jours avec AraC 30 mg.kg⁻¹ et ELT 100 mg.kg⁻¹ (Mann&Whitney).

En conclusion

ELT inhibe le transfert des électrons du complexe I et II et l'aconitase, enzyme du TCA. Ainsi en association avec AraC, il bloque l'adaptation mitochondriale des cellules conduisant à une synergie avec cette molécule. Cependant ELT ne permet pas de restaurer la sensibilité à l'Ida.

Partie 4 – Les macrophages participent à l’augmentation du fer dans les cellules résiduelles

Le microenvironnement médullaire participe à l’augmentation du fer mitochondrial en réponse à l’AraC

Le microenvironnement permet de nombreux échanges entre les cellules. Le fer étant peu synthétisé par les cellules, la participation des cellules avoisinantes est essentielle. J’ai alors regardé si des différences dans la régulation du contenu en fer en réponse à l’AraC sont observées en présence du microenvironnement *in vivo* et dans des échantillons de patient traités *ex vivo*. En effet, les échantillons de patient traités *ex vivo* ne montrent pas d’augmentation du fer mitochondrial mesuré par cytométrie avec la sonde RPA (**Figure 41A**) ou de PpIX (**Figure 41B, 41C**) après traitement à l’AraC alors que cette augmentation est systématique *in vivo* dans les PDX (**Figure 34B, 35B**). Ces résultats évoquent un rôle potentiel du microenvironnement dans l’augmentation du fer dans les blastes.

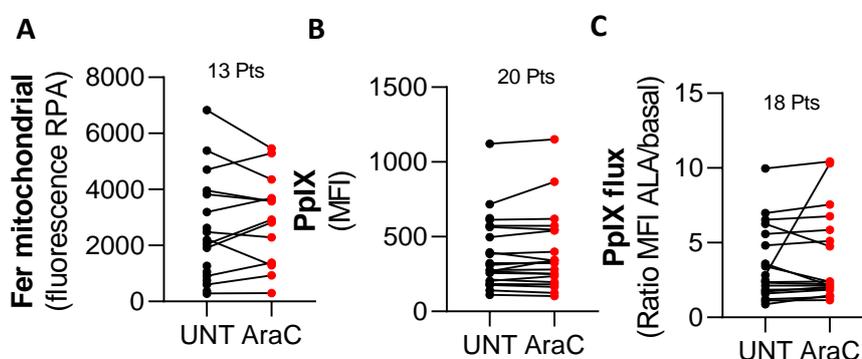


Figure 41: Ex vivo, l’AraC n’induit pas d’augmentation du fer mitochondrial dans les blastes leucémiques. Quantification dans les blastes de patients traités *ex vivo* à l’AraC 25 μ M du (A) fer mitochondrial par fluorescence de la sonde RPA (Médiane de fluorescence ; n=13), (B) contenu en PpIX (Médiane de fluorescence ; n=20), (C) flux d’incorporation d’ALA en PpIX (n=18)

A l’observation de ces résultats, j’ai souhaité analyser la contribution du microenvironnement médullaire dans l’apport de fer aux cellules leucémiques. Dans un modèle de lignée cellulaire injecté *in vivo* (CLDX), pour lequel les souris ont été préalablement traitées avec du busulfan 20 mg.kg⁻¹ en *i.p.* pour éliminer les cellules murines de la moelle osseuse (**Figure 42A**). J’ai alors observé par immunophénotypage en cytométrie de flux (**Figure 42B**), une diminution du nombre de macrophages dans les moelles osseuses des souris prétraitées par le Busulfan (**Figure 42C**). Associé à cette diminution, le contenu en fer mitochondrial est plus important dans les blastes leucémiques lorsque le pré-conditionnement au Busulfan n’a pas été réalisé (**Figure 42D**). Ces résultats montrent que le microenvironnement tumoral est nécessaire dans l’approvisionnement en fer des cellules leucémiques. Ainsi la diminution du nombre de macrophages pourrait suggérer un rôle de ces cellules dans l’apport en fer aux cellules leucémiques.

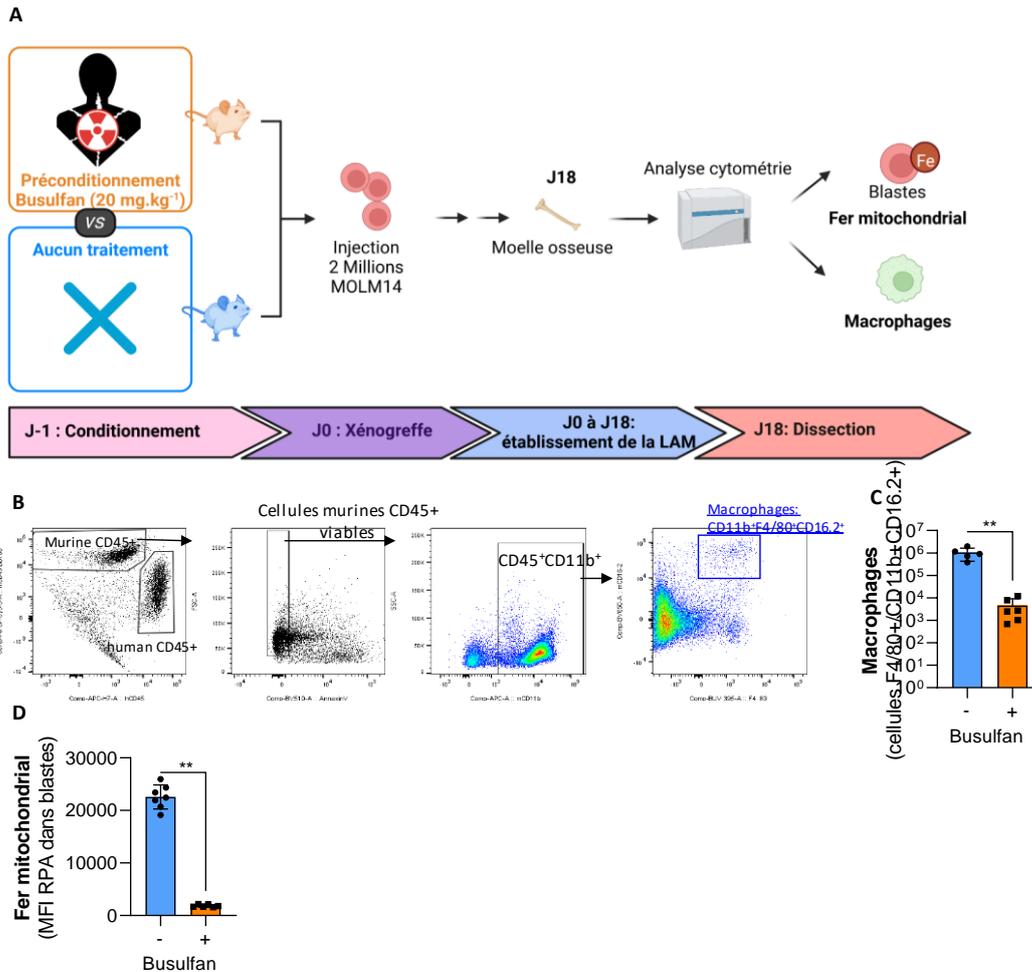


Figure 42: Le microenvironnement de la moelle osseuse appuie la demande en fer des cellules leucémiques. (A) Design expérimental d'expérience *in vivo* avec élimination du microenvironnement de la moelle osseuse par busulfan **(B)** Stratégie de fenêtrage pour analyse des macrophages *in vivo*. Les cellules murines CD45/CD45.1⁺ sont sélectionnées. Puis les cellules apoptotiques sont éliminées par un marquage en Annexine V avant une sélection des macrophages sur la base de l'expression de CD11b⁺/F4/80⁺/CD16.2⁺. **(C)** Nombre de macrophages et **(G)** contenu de fer mitochondrial (RPA) dans les cellules leucémiques en fonction du pré-conditionnement (non-busulfan n=7, busulfan n=6 ; Mann & Whitney)

Les macrophages modifient le contenu en fer des blastes leucémiques

Les macrophages étant des acteurs majeurs de l'érythrophagocytose, recyclant le fer, pourraient jouer un rôle majeur dans la mise à disposition du fer pour la résistance des cellules leucémiques. Nous avons précédemment montré qu'associé à une diminution de fer mitochondrial dans les blastes de la moelle osseuse avec pré-conditionnement au busulfan, il y a une diminution du nombre de macrophages. L'impact des macrophages sur les blastes est étudié grâce à des expériences de co-culture entre cellules de LAM U937 et des macrophages issus de monocytes humains polarisés *in vitro*. Dans un premier temps, le phénotype de polarisation des macrophages est validé suite aux différentes stimulations (**Figure 43A, Annexe 1**). Les macrophages polarisés vers un phénotype M1 (LPS+IFN γ) expriment davantage le CD80, qui avec son co-récepteur CD86 fournit le signal requis pour l'activation, l'expansion et la différenciation des lymphocytes T par une interaction avec CD28. L'expression de ce marqueur avec la perte d'expression membranaire des CD206 et CD163, marqueurs des macrophages M2 confirme la polarisation vers un phénotype pro-inflammatoire de type-

M1. Pour les macrophages ayant une activation alternative (M2), en présence d'IL-4 et IL-13, l'expression du CD206 augmente comparée aux M0 et aux M1. J'ai alors bien un phénotype différent qui correspond à ce qui est attendu entre mes différents tests d'activation (**Figure 43A**). La co-culture des macrophages avec les cellules U937 augmente le nombre de macrophages M0 et M2 mais pas des M1 (**Figure 43B**). Ces résultats indiquent que les blastes pourraient favoriser la prolifération *in vitro* des macrophages M2.

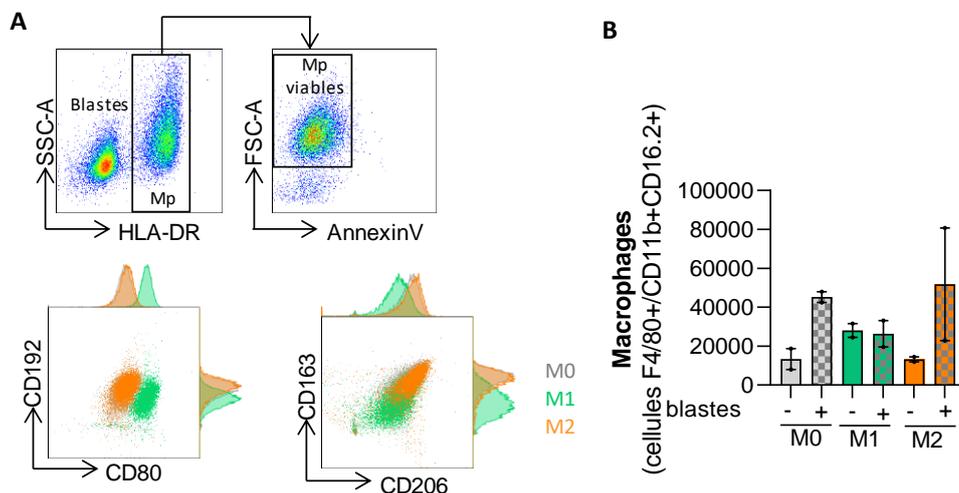


Figure 43: Les blastes leucémiques impactent le nombre de macrophages *in vitro*. (A) Analyse phénotypique des macrophages polarisés *in vitro* en phénotype M1 (IFN γ +LPS) ou en phénotype M2 (IL-4+IL-13). (B) Nombre de macrophages (CD11b $^{+}$ /CD14 $^{+}$ /CD16 $^{+}$) dans le puit après co-culture avec des blastes leucémiques de la lignée U937.

J'ai alors étudié l'effet de la co-culture avec les macrophages polarisés à partir de 4 donneurs de PBMCs différents sur la sensibilité à l'AraC des blastes de la lignée U937. Les macrophages de phénotype M1 impactent la survie des cellules de LAM. En réponse à l'AraC les macrophages de type M0 et M2 quant à eux rendent les cellules un peu plus résistantes à l'AraC comparé au contrôle sans co-culture (**Figure 44A**). De plus, le fer mitochondrial des macrophages est légèrement diminué en co-culture avec les blastes, supposant un don de fer aux cellules leucémiques (**Figure 44B**). En effet, le fer mitochondrial dans les blastes semble augmenté lors des co-cultures (**Figure 44C**). Des résultats complémentaires notamment par un dosage du fer cytosolique plutôt que mitochondrial sont nécessaires pour conforter ces observations.

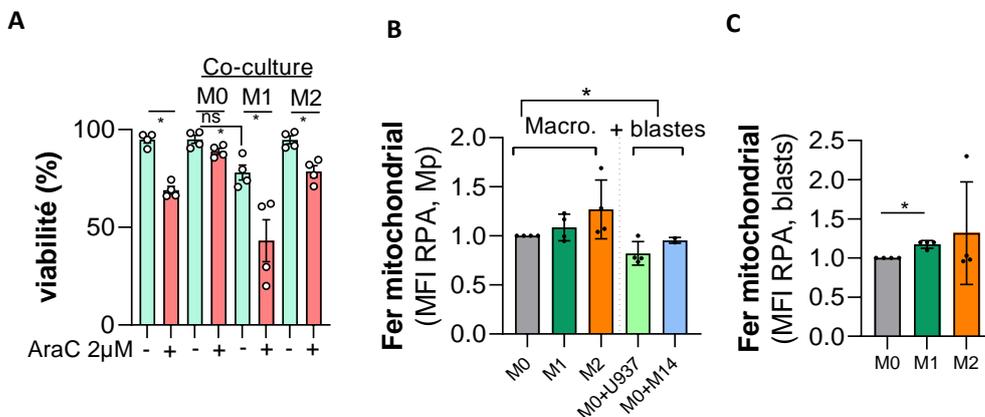


Figure 44: Les macrophages M2 soutiennent la résistance à l'AraC *in vitro*. (A) Viabilité mesurée par un marquage Annexine V suite au traitement à l'AraC 2 μ M pendant 24 h sur les blastes en co-culture avec les macrophages polarisés

différentiellement : non-polarisés (M0), M1 et M2 **(B)** Contenu en fer mitochondrial des macrophages après co-culture avec la lignée cellulaire de LAM U937. **(C)** Fer mitochondrial dans les blastes leucémiques U937 après co-culture avec les macrophages.

L'AraC impacte le contenu et l'activation des macrophages dans les moelles osseuses

Les macrophages semblant impacter le contenu en fer mitochondrial, nous avons émis l'hypothèse que ces macrophages pourraient, d'une part être augmentés en réponse à la chimiothérapie et, d'autre part que l'AraC pourrait modifier leur polarisation vers un phénotype M2 dont l'expression importante de FPN permettrait de mettre le fer à disposition des blastes. Nous avons alors caractérisé les macrophages contenus dans les moelles osseuses des souris NSG traitées à AraC 60 mg.kg⁻¹.jour⁻¹ pendant 5 jours **(Figure 45A)**. Malgré une toxicité de l'AraC sur ce compartiment cellulaire diminuant leur nombre **(Figure 45B)**, il y a une tendance à l'augmentation de leur pourcentage dans les moelles osseuses de 2 PDXs **(Figure 45C)**. Parmi ces macrophages, il n'y a pas de différence sur la polarisation en M1 par contre, le pourcentage de macrophages CD206 positifs, marqueur des M2, a une tendance à l'augmentation suite au traitement à l'AraC dans le TUH162 et le CLDX U937 **(Figure 45D, 45E)**. De façon intéressante, il n'y a aucune différence dans le contenu en macrophage du PDX TUH130. Ce PDX est réfractaire à l'AraC in vivo (donnée non montrée) or, la polarisation des macrophages est déjà dans ce patient en faveur du phénotype M2 alors que les M1 sont très peu représentés.

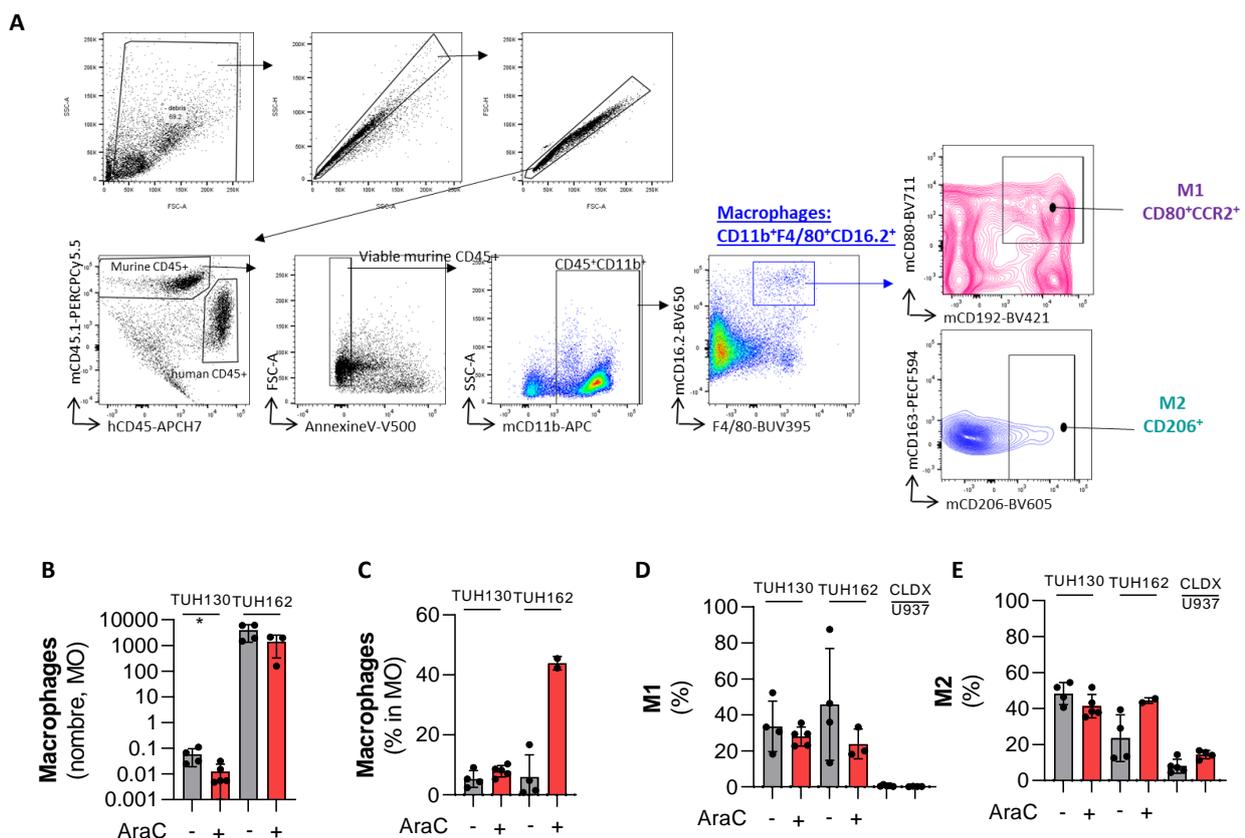


Figure 45: Le phénotype des macrophages en réponse à l'AraC in vivo. (A) Stratégie d'analyse du phénotype des macrophages dans les moelles osseuses des souris NSG. Contenu en macrophages en **(B)** nombre absolu et **(C)** pourcentage dans les moelles osseuses de souris traitées à l'AraC. **(D)** Polarisation des macrophages M1(CD192⁺/CD163⁺) et **(E)** M2 (CD206⁺) dans les moelles osseuses de souris traitées à l'AraC.

L'immunophénotypage des macrophages dans les moelles osseuses *in vivo*, en réponse à l'AraC suggère que ceux-ci sont orientés vers un phénotype anti-inflammatoire M2. Pour analyser la réponse immune dans ces animaux, j'ai analysé la présence de cytokines connues pour être impliquées dans la polarisation des macrophages sécrétées dans les sérums des souris xéno greffées et traitées à l'AraC en méthode multiplexée. En réponse à l'AraC, il y a une augmentation de la concentration des cytokines pro-inflammatoires CXCL1 et une augmentation non-significative d'IL-6 (**Figure 46A, 46C**). Par contre, dans le modèle utilisé, les autres cytokines pro-inflammatoires (IL-18, TNF α , IL-12p70, IL-1 β) ne sont pas impactées dans les sérums après traitement avec AraC (**Figure 456, 46D, 46E, 46F, 46G**). CXCL1 est une molécule chemoattractante qui pourrait participer à la migration des cellules leucémiques dans des microenvironnements favorables à la survie des cellules. Parmi les cytokines anti-inflammatoires le G-CSF est largement augmenté alors que CCL22, CCL17 et TGF β 1 sont diminuées (**Figure 46I, 46J, 46K, 46L**). La concentration de l'interleukine IL-10 quant à elle n'est pas modifiée dans les sérums de ces modèles (**Figure 46H**). Ainsi en réponse à l'AraC, les souris NSG xéno greffées avec des cellules de LAM, semblent induire un profil de sécrétion de cytokines pro-inflammatoire. La diminution des cytokines CCL22, CCL17, et TGF β 1 suggère une balance en faveur d'une réponse immunitaire de type Th1. Cependant l'augmentation de G-CSF, cytokine impliquée dans la migration des neutrophiles, pourrait relever d'un rôle potentiel de ces cellules dans la réponse à l'AraC des cellules de LAM *in vivo*. La sécrétion de cette cytokine par les cellules leucémiques pourra être validée par analyse dans des souris non-xéno greffées vs. injectées par des cellules LAM,

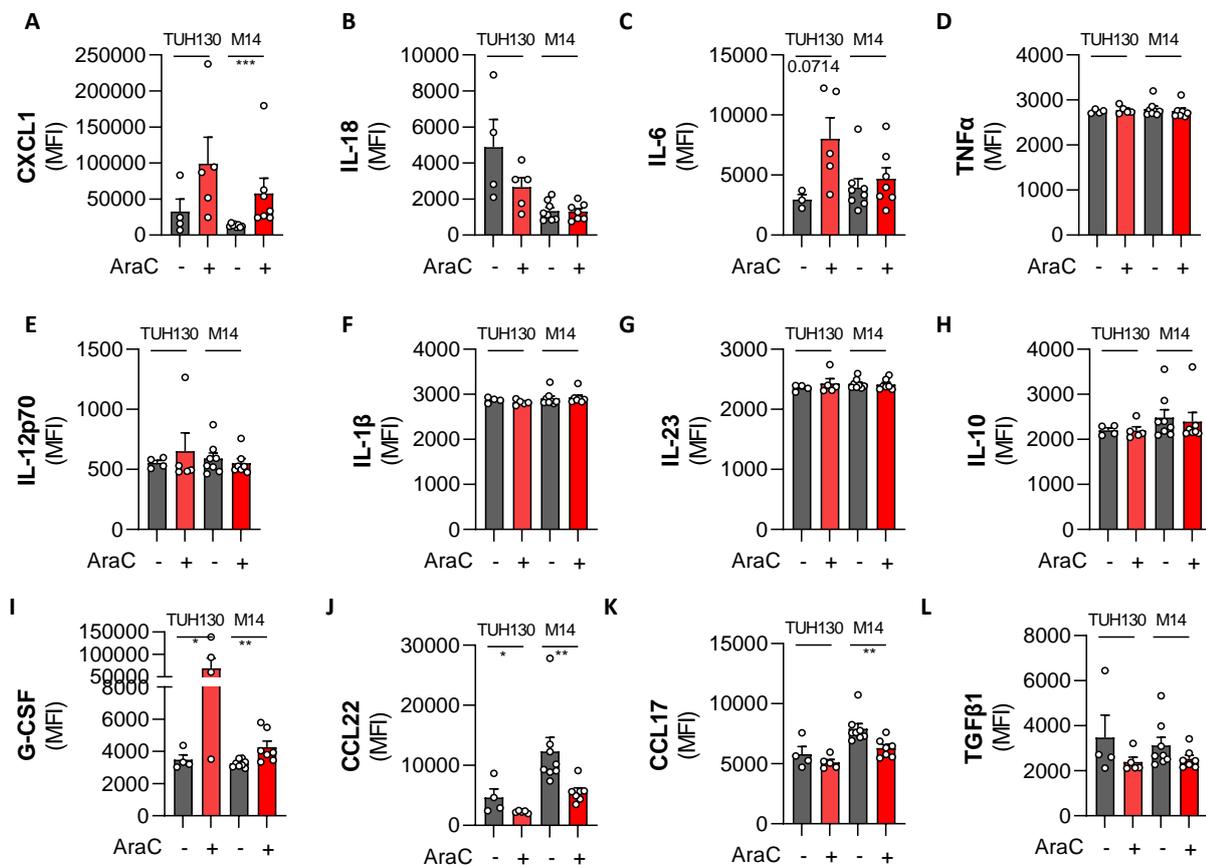


Figure 46: L'AraC modifie la sécrétion de cytokines inflammatoires *in vivo*. Dosage des cytokines dans le sérum des souris après 5 jours de traitement à l'AraC (F) CXCL1 (G) IL-18, (H) IL-6, (I) TNF α , (J) IL-12p70, (K) IL-1 β , (L) IL-23, (M) IL-10, (N) G-CSF, (O) CCL22, (P) CCL17, (Q) TGF β 1. (MFI=intensité de fluorescence, t-test Mann and Whitney).

En conclusion,

Les cellules du microenvironnement contribuent à l'augmentation en fer des cellules leucémiques. Les macrophages de phénotype M2 en co-culture in vitro, réduisent la réponse à l'AraC alors que les macrophages de phénotype M1 affectent la viabilité des blastes leucémiques. In vivo, dans des souris NSG, la chimiothérapie à l'AraC oriente le phénotype des macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire de type M2. Cependant, les cytokines libérées dans le sérum des animaux ne reflètent pas cette activation. Il semblerait que le profil de la moelle osseuse soit en faveur de la migration des cellules leucémiques avec la production de CXCL1 et d'une réponse immunitaire pro-inflammatoire de type Th1. L'augmentation de la sécrétion de G-CSF pourrait impliquer les neutrophiles dans la résistance à l'AraC.

Partie 5 - Cibler le métabolisme du fer comme une solution thérapeutique pour les patients de mauvais pronostic

Le statut mutationnel prédictif de la réponse à la combinaison AraC/ELT

Dans l'objectif de cibler l'utilisation d'ELT et d'établir des voies potentielles de résistance à la combinaison AraC et ELT, j'ai évalué la réponse de la double thérapie. J'ai alors analysé dans le détail la réponse des échantillons patients traités *ex vivo* présentés en figure 39. L'analyse de la réponse à la combinaison *ex vivo* à AraC/ELT, permet la stratification de deux profils de réponse : ceux pour lesquels la combinaison améliore la réponse à l'AraC (« sensibles ») et ceux pour lesquels celle-ci n'augmente pas la mort induite par l'AraC (« Résistants ») (**Figure 47A**). Ainsi dans la cohorte étudiée, un tiers des patients analysés résiste à la bithérapie (31 patients résistants, 62 patients sensibles à la combinaison). La réponse à l'AraC est moins importante pour les patients répondent à la combinaison, sensibles à cette bithérapie (**Figure 47C**). En effet, les médianes de viabilité post-traitement avec AraC sont de 67.2% dans le groupe des patients résistants et 80.8 % dans le groupe des patients sensibles à la combinaison. Ainsi, l'association des deux molécules semble donner un espoir dans la réponse des patients qui répondent moins bien à l'AraC. Pour les patients qui résistent à cette combinaison, l'effet observé semble même antagoniste. En effet, la survie en médiane est augmentée de 10% lors de l'association des deux molécules AraC/ELT comparé à l'AraC seul avec des médianes de viabilité respectives de 67.2% pour le traitement à l'AraC 25 μ M seul et 75.1 % de viabilité pour la combinaison ELT+AraC (**Figure 47B, 47C**).

Dans la diversité génétique des patients, les mutations orientent le diagnostic. J'ai alors demandé au service clinique les caractéristiques cliniques des échantillons testés dans l'étude. Une représentation visuelle des profils mutationnels (oncoprint) et la fréquence mutationnelle en fonction de la réponse à la combinaison AraC/ELT sont réalisés pour permettre l'identification de profils qui permettraient de prédire la réponse ou la résistance à cette association thérapeutique. Les mutations NPM1, CEBP α , DNMT3a, TET2, ASXL1, NRAS, KRAS et FLT3-ITD ne modulent pas la réponse à la combinaison AraC/ELT. De façon intéressante, les patients porteurs des mutations IDH2 sont enrichis dans les patients résistants à la combinaison AraC/ELT. Les mutations p53 et FLT3-TKD sont quant à elles enrichies dans le groupe de ceux qui répondent à cette thérapie (**Figure 47F, 47G**). La combinaison pourrait alors être un espoir thérapeutique pour les patients porteurs de ces mutations.

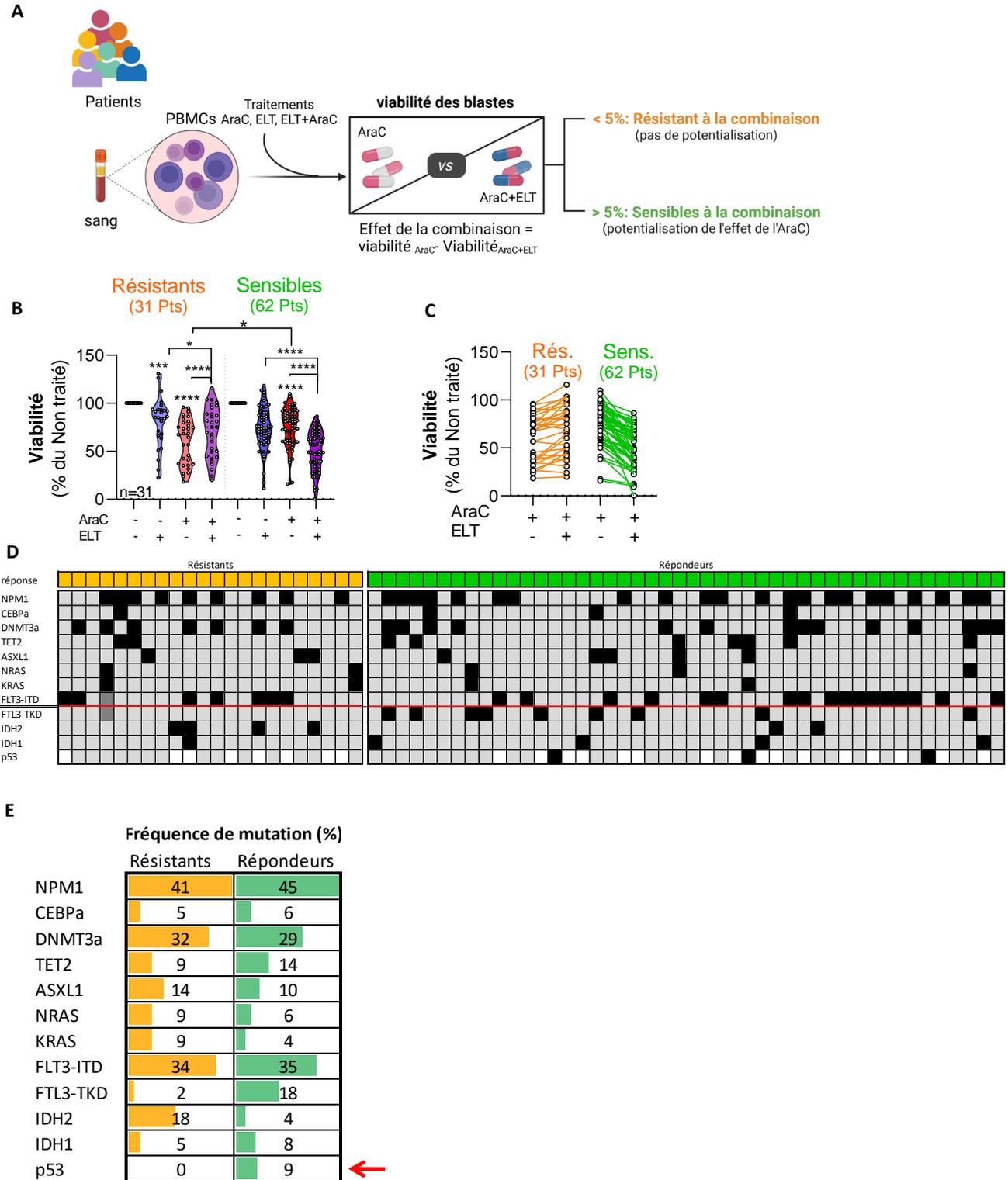


Figure 47: Combinaison ELT/AraC: une réponse différentielle suivant le statut mutationnel? (A) Design d'analyse de la combinaison ex vivo entre AraC et ELT. (B) Réponse aux traitements en fonction du statut de réponse (t-test, apparié) (C) Représentation appariée de la réponse entre AraC et la combinaison. (D) Oncoprint mutationnel des patients testés (gris : non-muté, noir : muté, blanc : non-génotypé) (E) Fréquence mutationnelle.

En conclusion

La combinaison thérapeutique ex vivo entre AraC et ELT est inefficace, restaurant même la viabilité induite par l'AraC, chez environ 30 % des patients LAM. La mutation IDH2 semble prédire cette résistance. Cependant, l'association entre les deux molécules est efficace chez les patients les plus résistants à l'AraC. En particulier, cette association semble améliorer la sensibilité des patients porteurs de la mutation p53 .

Discussion et perspectives

I. Le fer mitochondrial : un cofacteur essentiel à la biologie des LAM ?

Ce travail a mis en évidence le rôle essentiel du métabolisme du fer dans la survie et la prolifération des cellules de LAM et en particulier dans le maintien de l'activité OxPHOS des cellules résistantes aux chimiothérapies. Nous avons déterminé qu'ELT est un chélateur de ce fer et son utilisation impacte la survie et la prolifération des cellules leucémiques (**Figures 25, 28**). Cette molécule diminue l'expression de la ferritine mitochondriale FTMT, qui ne possède pas de séquence IRE (Guaraldo et al., 2016) suggérant des régulations du fer en réponse à ELT au-delà de la régulation par IRP1 (**Figure 28**). Jusqu'ici il était décrit qu'ELT induit de la mort cellulaire par apoptose *via* une chélation du fer cellulaire (Kalota et al., 2015; Roth et al., 2012). Cette chélation, conduit à une modulation de la traduction des protéines dont les ARN messagers comportent la séquence de réponse au fer (IRE). Parmi ces protéines, le transporteur à la transferrine (CD71) ainsi que les ferritines FTH1 et FTL sont impactées. Ce travail a validé la régulation de l'expression des protéines de réponse au fer FTH1, FTL et CD71 mais également ALAS2 et ACO2 en réponse à ELT (**Figures 28, 29**). Le premier événement de réponse à la molécule est la chélation des ions qui précède l'induction de l'expression de CD71 et la mort cellulaire par apoptose mitochondriale (**Figure 27**). L'induction de l'apoptose est alors une conséquence de la chélation du fer. La chélation du fer mitochondrial par ELT conduit à une inhibition des enzymes mitochondriales de la biosynthèse des hèmes et de l'assemblage des motifs Fe-S indispensables à l'activité mitochondriale (**Figures 29,30**). Cependant, les données de mesure du fer labile par la calcéïne montrent une augmentation supérieure de la fluorescence avec ELT comparé aux chélateurs de fer connus suggérant qu'ELT modifie également le contenu en autres ions cellulaires. Les données de métabolomique ont également montré une augmentation de la consommation de pyruvate avec une augmentation des premiers intermédiaires du cycle de Krebs : citrate et cis-aconitate (**Figure 36**). La modulation de la concentration de ces métabolites pourrait impliquer une mort cellulaire par cuproptose (Tang et al., 2022; Tsvetkov et al., 2022). Cette nouvelle voie de mort cellulaire dépendante du cuivre conduit à une désintégration des protéines Fe-S et à l'agrégation des protéines mitochondriales lipoylées (PDH, IDH). Ainsi, l'implication de cette voie de mort cellulaire pourrait expliquer la diminution des protéines Fe-S observée en réponse à ELT. La ferredoxine 1 étant un médiateur nécessaire à la cuproptose, nous pourrions alors analyser la participation de cette voie à la mort induite par ELT avec une invalidation génétique de cette protéine. Ainsi, si cette voie de mort cellulaire est indispensable à la sensibilité des cellules de LAM à ELT nous aurions une résistance à la molécule.

En réponse à ELT l'expression la plupart des protéines Fe-S analysées est diminuée. Cependant Cisd2, protéine [2Fe-2S] de la famille NEET, est augmentée en réponse à ELT (**Figure 30B**). Cette protéine pourrait participer à l'établissement des sites de contacts entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries (Janssen and Boyle, 2019). Ces contacts sont connus pour réguler l'homéostasie du calcium, l'intégrité du réticulum endoplasmique et la fonction mitochondriale. Dans les LAM, ils favorisent la prolifération tumorale. Inhiber ces contacts avec un shVDAC1 a montré une amélioration

de la survie dans des modèles de xénogreffe de LAM (Bosc et al., 2020). Les contacts entre réticulum endoplasmique et mitochondries participent aussi à l'homéostasie du fer (Karmi et al., 2021; Xue et al., 2017). En effet, leur rupture entraîne une accumulation de fer dans les mitochondries. Nous pourrions alors imaginer un échange entre les deux compartiments. L'augmentation de cette protéine pourrait alors induire un renforcement de ces contacts en réponse au stress mitochondrial et en particulier permettrait de réguler ce cofacteur essentiel au maintien de l'activité OxPHOS. En complément, CISD2 trouve une implication dans le contrôle du stress du réticulum-endoplasmique (Huang et al., 2018) qui lui-même induit l'expression d'hepcidine (Vecchi et al., 2009). La régulation de cette hormone par CISD2 affecterait alors la disponibilité en fer systémique.

L'ensemble de ces observations témoignent d'un rôle déterminant de la voie de synthèse des Fe-S. Ces motifs sont le carrefour dans l'activité de nombreuses protéines impliquées dans la biosynthèse des hèmes (FECH), la survie cellulaire (réparation ADN, réplication), les contacts entre réticulum endoplasmique et mitochondrie (CISD2), le contrôle de l'ouverture du pore de perméabilité membranaire (CISD1) ou encore le métabolisme (ACO, SDH). Cibler cette voie d'utilisation du fer par ELT, induit de la mort cellulaire dans les cellules de LAM et pourrait alors permettre une rémission des patients.

II. Les macrophages régulateurs de la disponibilité en fer ?

Le microenvironnement leucémique est un soutien connu de la résistance thérapeutique dans les LAM. Même si plusieurs mécanismes permettant d'expliquer comment les cellules du microenvironnement contribuent à la chimiorésistance ont déjà été mis en évidence (Méndez-Ferrer et al., 2020; Raghavan et al., 2021; Stuani and Sarry, 2020; Tabe and Konopleva, 2014), de nombreuses études sont encore nécessaires. Le fer étant indispensable à la prolifération et à la survie des cellules leucémiques, il est nécessaire de comprendre comment les cellules leucémiques s'approvisionnent en fer.

Au cours de mon projet j'ai donc mis en évidence que le pré-conditionnement au busulfan qui éradique les cellules du compartiment médullaire murin réduit la concentration en fer mitochondrial dans les blastes leucémiques (**Figure 42**). Les cellules présentes à proximité des cellules leucémiques permettent donc d'augmenter le contenu en fer mitochondrial des cellules de LAM. Ayant montré que le fer est enrichi dans les cellules résistantes (**Figures 32, 33, 34**), cet ion non synthétisable provient nécessairement d'une source proche. Les macrophages peuvent recycler le fer des érythrocytes sénescents et des débris cellulaires. L'augmentation de la coloration de Perl's en réponse à l'AraC peut être liée à une augmentation du nombre de macrophages (**Figure 33**). Ces macrophages peuvent provenir d'une prolifération dans le tissu ou d'une augmentation de leur recrutement. Dans les expériences de co-culture *in vitro*, nous avons observé que les cellules de LAM augmentent le nombre de macrophages de phénotype M0 et M2 laissant penser qu'ils favorisent la prolifération de ces deux types de macrophages (**Figure 43**). Il serait alors intéressant pour valider cette hypothèse d'évaluer la prolifération de ces cellules avec un marqueur de prolifération cellulaire et l'expression des cytokines impliquées dans la prolifération ou la survie des macrophages (CSF-1, IL-34). Des expériences de milieux conditionnés provenant de cellules leucémiques permettraient

d'identifier, par des techniques de protéomique ou métabolomique, et de confirmer qu'un facteur exogène sécrété par les cellules leucémiques participe à cette augmentation du nombre de macrophages. Le phénotype des macrophages M0 obtenu dans ces expériences de co-culture *in vitro* est très proche du phénotype des macrophages M2 (**Figure 43A**). Pour mener des analyses comparatives entre ces deux différenciations, il serait nécessaire d'ajuster le milieu de culture utilisé. J'ai utilisé un milieu IMDM pour la culture des macrophages car j'avais pour objectif de cultiver par la suite, les cellules de LAM avec des macrophages issus des patients LAM. Or, dans la littérature, le milieu utilisé pour cultiver les macrophages est le RPMI 1640. Le milieu IMDM contient le double de glucose ainsi que des concentrations en acides aminés plus importantes. Le métabolisme pouvant influencer la polarisation des macrophages, les composants des milieux ont pu affecter celle-ci en faveur du phénotype M2. Cependant, malgré les limites évoquées, les macrophages de phénotype M1 induisent la mort des cellules leucémiques de la lignée U937 tandis que les macrophages de phénotype M2 permettent une meilleure résistance à l'AraC (**Figure 44 A**). Les macrophages de phénotype M2 semblent alors protéger de la mort induite par chimiothérapie.

Enfin, pour étudier le microenvironnement nous avons regardé l'impact de l'AraC sur les macrophages dans des modèles de PDX et CLDX. *In vivo*, nous observons une modulation de la polarisation en macrophages en réponse à l'AraC. Il y a une augmentation du pourcentage de macrophages de phénotype M2 avec des modifications des cytokines présentes dans les sérums (**Figures 45C, 46**). Cependant, le modèle utilisé, un modèle immunodéficient NGS muté pour le récepteur à l'IL2 γ ne permet pas une analyse exacte et représentative de l'immunité. En effet, cette mutation inactive les lymphocytes B, T et NK mais affecte également l'expression de plusieurs interleukines expliquant partiellement le fait qu'aucune cytokine de la famille des interleukines ne soit modulée en réponse à l'AraC *in vivo* (**Figure 46**). La validation dans un modèle immunocompétent exprimant la protéine de fusion MLL-AF9 driver de LAM et établi dans un fond génétique C57/BJ6 est nécessaire.

Dans ce projet j'ai observé également que l'effet d'ELT n'est pas spécifique des cellules de LAM mais je n'ai pour le moment pas exploré son impact sur les cellules du microenvironnement. Il serait important d'analyser la contribution du fer dans les cellules normales. En effet, cet ion est indispensable à la différenciation hématopoïétique. J'ai observé dans des données préliminaires réalisées sur les cellules de quatre patients LAM et un patient sein, cultivés en méthylcellulose avec ELT 5 et 10 μ M, une diminution des colonies de phénotype granulocytique en faveur des monocytes dans les cellules LAM. Cette altération de la différenciation hématopoïétique n'a pas été observée sur les cellules issues du patient sein. Ces données sont à compléter mais suggèrent qu'aux drogues utilisées ELT a peu d'effet sur le compartiment normal.

Ces observations, montrent que les cellules de l'environnement médullaire sont déterminantes pour le contenu en fer des cellules leucémiques suggérant un dialogue entre cellules. L'augmentation des macrophages de phénotype M2, riches en FPN et donc capables de reléguer du fer dans le milieu environnant suggère une participation de ces cellules qui reste à approfondir. J'ai observé dans les expériences de polarisation *in vitro* que le taux de fer mitochondrial lors de la co-culture diminue dans les macrophages et augmente dans les blastes leucémiques (**Figure 44**). Ainsi pour établir un vrai dialogue nous pourrions imaginer de cultiver les macrophages avec un fer traçable (fluorescence ou isotope) avant la mise en co-culture. Ainsi, après co-culture nous pourrions observer si le fer intégré

dans les macrophages est présent dans les blastes leucémiques pouvant valider un échange entre les deux types cellulaires.

III. Cibler le fer mitochondrial : une cible thérapeutique prometteuse pour les patients porteurs de la mutation p53 ?

Les patients porteurs de la mutation p53 sont classés dans un risque défavorable. Malgré un faible nombre de patients mutés pour p53 dans la cohorte utilisée dans cette étude, ceux-ci font exclusivement parti de ceux qui ont bien répondu à la combinaison (**Figures 47F, 47G**). Ainsi ces données pourraient offrir de nouvelles opportunités thérapeutiques pour ces patients.

Cette susceptibilité à la combinaison entre AraC/ELT suggère que ces mutations confèrent un métabolisme du fer mitochondrial particulier leur permettant de résister aux thérapies actuelles. Il est décrit dans la littérature que les gènes *FXN*, *ISCU*, *FDXR* et *HAMP* sont régulés par p53. La *FXN* et *ISCU* sont impliquées dans la synthèse des Fe-S (Lacroix et al., 2020). Nous pourrions alors identifier dans le contexte de la LAM comment et si les mutations de p53 modifient l'homéostasie du fer mitochondrial. Pour cela nous disposons, par établissement de collaborations (S. Skuli, Université de Pennsylvanie ; S. Boettcher, Boston), des lignées cellulaires de LAM modifiées par approche CRISPR pour exprimer les mutations anti-sens de p53 (Boettcher et al., 2019). Nous pourrions dans un premier temps valider la susceptibilité de ces modèles aux molécules connues pour diminuer le fer mitochondrial (ELT et ironomycine). Ainsi nous pourrions caractériser les dérégulations de l'homéostasie du fer mitochondrial liées à ces mutations *in vitro* et *in vivo*. Des expérimentations préliminaires ont montré que les cellules mutées pour p53 diminuent l'expression des ferritines cytosoliques et augmentent la ferritine mitochondriale. La FTMT en complexant le fer permet de protéger le stress oxydatif induit par une quantité exacerbée de fer. En particulier elle protège de l'induction de la ferroptose. Des études ont montré que p53 réprime le transporteur de la cystéine SLC7A11 nécessaire à la ferroptose (Jiang et al., 2015). La perte de fonction de p53 associée à la mutation conduirait à une activation de cette voie. Ainsi, l'induction de FTMT protégerai de la mort induite par l'activation de la ferroptose. ELT ciblerait d'une part l'expression de la FTMT et la ferroptose induites par la mutation de p53 restaurant la sensibilité de ces cellules aux chimiothérapies actuellement utilisées en clinique.

IV. Cibler le fer mitochondrial une stratégie thérapeutique à adapter ?

Nos travaux et ceux de nombreux groupes ont montré que la mitochondrie participe à la résistance aux chimiothérapies des cellules de LAM. Dans ce contexte, nous montrons plus spécifiquement que les cellules résiduelles après traitement à l'AraC augmentent leur contenu en fer mitochondrial (**Figure 34**). Ce fer participe directement à la biosynthèse des hèmes et des Fe-S nécessaires pour maintenir l'activité « *high OxPHOS* » des cellules résistantes (**Figure 38**). Ce travail a montré que l'augmentation du fer mitochondrial avec AraC est également liée à une augmentation de la synthèse de l'hème et des Fe-S (**Figure 35**). Le ciblage du fer mitochondrial avec ELT améliore la réponse à l'AraC *in vitro* et *in vivo* (**Figures 39, 40**). Cependant, en association avec Ida, un effet

antagoniste a été observé (**Figure 39B, 39C**). Des études ont reporté que les anthracyclines, peuvent interagir avec les séquences d'ARNm de liaison d'IRP1 (Kwok and Richardson, 2002). Ainsi, cette interaction conduit à une régulation de l'homéostasie du fer. Par celle-ci, les cellules ne parviendraient plus à répondre au stress induit par ELT. Ainsi en traitement concomitant, ELT pourrait permettre d'éradiquer les cellules résistantes à l'AraC mais l'association avec une anthracycline pourrait enlever le bénéfice de cette association. La mauvaise combinaison thérapeutique pourrait alors participer à l'échec de l'essai clinique de phase II en association avec la chimiothérapie intensive selon le modèle « 7+3 ».

Le fer mitochondrial pourrait également participer à la résistance au Vénétoclax, inhibiteur de Bcl-2 utilisé dans le traitement des LAM. Nous avons observé dans des analyses de séquençage d'ARN en cellule unique, que la ferritine chaîne lourde FTL est enrichie avec des sous-unités du complexe I dans les cellules résistantes au Vénétoclax+AraC *in vivo* (Bosc et al., 2020). ELT ciblant ces voies, nous pourrions envisager de l'essayer en consolidation de traitement Vénétoclax+AraC. Son utilisation après chimiothérapie Vénétoclax+AraC pourrait cibler les voies impliquées dans la résistance au traitement de première ligne et améliorer la rémission des patients. Des chercheurs de l'institut Curie et de Melbourne ont identifié que l'Ironomycine, un dérivé de la Salinomycine, séquestre le fer dans les lysosomes diminuant son apport à la mitochondrie. Cette molécule augmente le recrutement mitochondrial des protéines pro-apoptotiques Bak et Bax et améliore la sensibilité au Vénétoclax (Garciaz et al., 2021). A contrario, des résultats préliminaires indiquent que ELT ne sensibilise pas la lignée au Vénétoclax *in vitro* et *in vitro* (**données non montrées**). Or, ELT peut se lier à Bax empêchant son recrutement à la mitochondrie (Spitz et al., 2021). Il semble alors que l'activation de Bak et Bax soit indispensable à la sensibilisation des cellules au Vénétoclax par un chélateur de fer. Il pourrait alors être intéressant d'étudier les différences dans le mécanisme d'action de ces deux molécules qui pourraient avoir des usages ciblés complémentaires. Par exemple, j'ai montré que ELT pourrait être utilisé pour guérir les LAM mutées pour p53 de très mauvais pronostic dans les LAM.

L'ensemble de ces observations indiquent qu'il est nécessaire d'adopter une stratégie thérapeutique adaptée aux mécanismes de persistance pour éradiquer les cellules résistantes aux thérapies. En effet, l'essai clinique de phase II d'ELT en association avec la chimiothérapie intensive a été avorté à cause d'un manque de bénéfice pour les patients. Il se pourrait que l'association dans cet essai avec Ida+AraC, par le biais de l'antagonisme entre Ida et ELT, ait inhibé le bénéfice qu'aurait pu procurer la molécule. L'accès aux données du nouvel essai EPAG-2015 qui utilise ELT en consolidation de la chimiothérapie intensive mené par le *French innovative leukemia organization* (FILO) permettra de définir si ce schéma thérapeutique améliore le bénéfice clinique d'ELT (**Annexe 2**). De même cet essai mené sur 115 patients permettra de vérifier la relevance clinique des mutations identifiées pour prédire la réponse à la combinaison AraC/ELT (IDH2, FLT3-TKD, p53) en traitement d'échantillons issus de patients *ex vivo*.

Conclusion

De nombreuses études démontrent aujourd'hui l'importance du métabolisme énergétique et de l'adaptation mitochondriale dans la résistance aux thérapies. Les cellules leucémiques possèdent une flexibilité métabolique qui leur permet de soutenir un métabolisme oxydatif accru en réponse à un stress tel que celui induit par l'AraC. Cependant, cette activité oxydative nécessite l'apport de cofacteurs dont aujourd'hui l'implication est encore peu documentée. Le fer est un cofacteur essentiel au transfert d'électrons et au transport de l'oxygène indispensables à l'activité oxydative des cellules. Les mitochondries ont un rôle central dans le métabolisme de cet ion. En effet, l'insertion du fer dans les hèmes et les protéines Fe-S se réalise dans cet organite. Cet ion ne peut être synthétisé par les cellules, la majorité de celui-ci est recyclé, en particulier par l'érythrophagocytose des macrophages. Même si plusieurs études ont montré qu'une chélation du fer affecte la survie des cellules cancéreuses, l'implication de celui-ci dans la réponse aux stress causés par les chimiothérapies n'est pas caractérisée. A ce titre, nous avons émis l'hypothèse que le fer mitochondrial pourrait participer au maintien de l'activité mitochondriale nécessaire à la survie des cellules aux chimiothérapies actuelles et que l'apport du fer pourrait être régulé par les macrophages.

Nous avons observé que les cellules résistantes à l'AraC augmentent leur synthèse de Fe-S et hème indispensables à la synthèse des ETC et des cofacteurs nécessaires pour maintenir une activité mitochondriale élevée. ELT, en chélatant le fer mitochondrial inhibe ainsi l'adaptation mitochondriale des blastes leucémiques en réponse à l'AraC. En revanche, le statut mutationnel des cellules semble définir leur sensibilité à la combinaison entre AraC et ELT. Nous avons ainsi établi que les cellules mutées pour IDH2 sont résistantes à cette thérapie alors qu'elle offre de réels espoirs thérapeutiques pour le traitement des patients mutés pour p53 et FLT3-TKD. Cette découverte suggère que ces mutations modifient l'homéostasie du fer mitochondrial. Ces données seront complétées avec l'étude en essai clinique EPAG-2015 (**Annexe 2**).

Nous avons alors confirmé que le fer dans les cellules leucémiques provient du microenvironnement. De plus, l'AraC modifie la polarisation des macrophages de la moelle osseuse vers un phénotype M2. Ce phénotype permet de résister à l'AraC comparé aux macrophages de phénotype M1. De plus, en co-culture les macrophages diminuent leur quantité de fer suggérant qu'ils pourraient le céder aux blastes.

L'objectif de ce travail était de mieux caractériser les dérégulations de l'homéostasie du fer dans les blastes leucémiques. Notamment, je me suis intéressée à la régulation du fer mitochondrial dans les blastes résistants à l'AraC. Ainsi, l'ensemble de ce travail a permis de définir que le fer est essentiel à la survie des LAM et à l'adaptation mitochondriale des cellules en réponse à l'AraC. Cibler le fer pourrait alors être une solution d'avenir dans la prise en charge des patients. Ceci est notamment le cas, pour les patients mutés pour p53 qui arborent un métabolisme du fer mitochondrial réorganisé leur conférant une résistance à l'AraC qui pourrait être contournée par l'association avec ELT.

L'ensemble de ce projet permet aujourd'hui de mieux définir les dérégulations de l'homéostasie du fer liées au traitement et à la résistance à l'AraC et indique que cibler ce métabolisme du fer pourrait améliorer significativement la réponse au traitement des patients atteints de LAM (Figure 48).

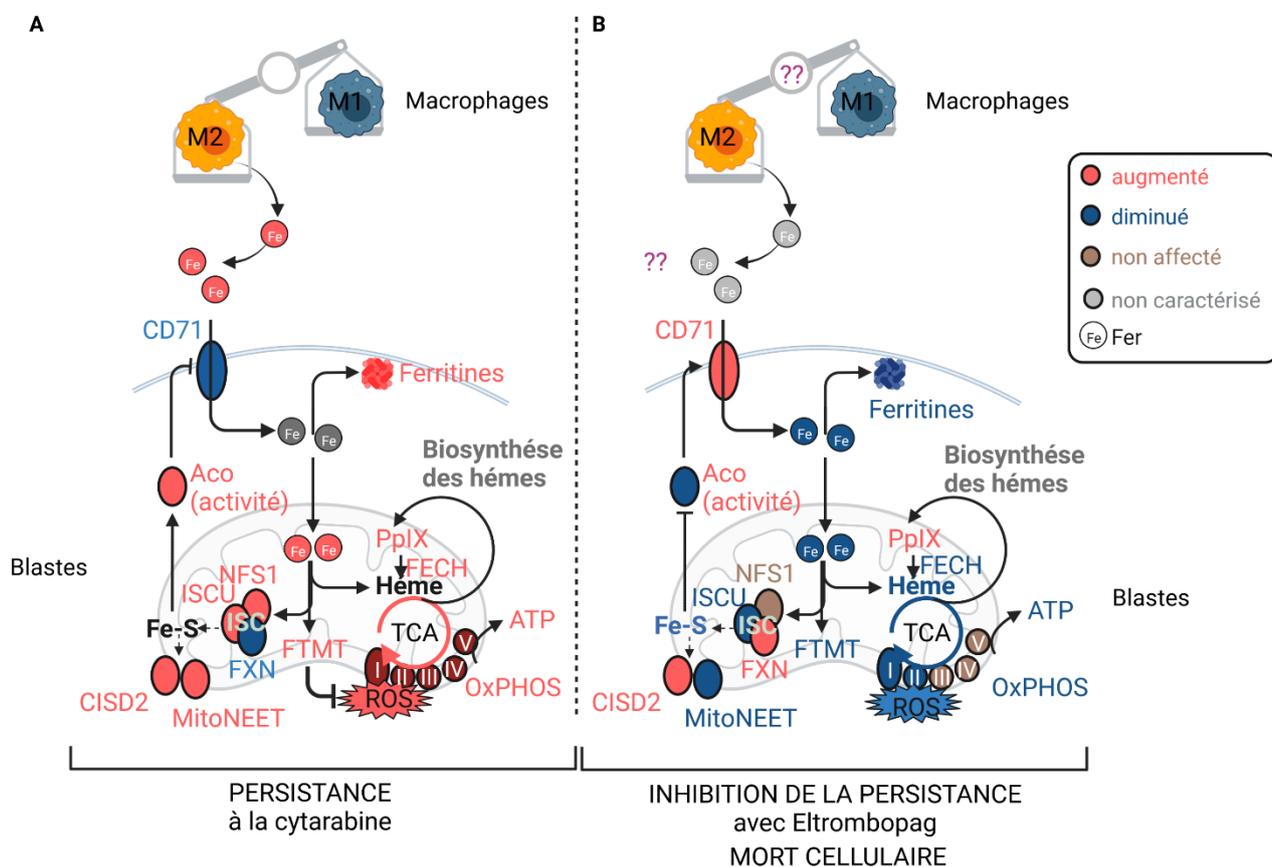


Figure 48: ELT inhibe la persistance à l'AraC des blastes leucémiques. (A) L'AraC modifie l'homéostasie du fer mitochondrial. Le traitement à la molécule augmente le contenu en fer mitochondrial avec une augmentation de la biosynthèse des hèmes, des protéines NFS1 et ISCU impliquées dans la biogénèse des Fe-S (ISC) et de la ferritine mitochondriale. L'ensemble de ces mécanismes supportent l'augmentation des capacités oxydatives et permettent la persistance des cellules. **(B)** L'ajout d'ELT, chélateur du fer mitochondrial, inhibe cette utilisation du fer et par conséquent son utilisation pour l'adaptation mitochondriale en réponse à l'AraC. Cette molécule permet alors l'induction de la mort cellulaire des cellules persistantes.

Bibliographie

- Aisen, P., Enns, C., Wessling-Resnick, M., 2001. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 33, 940–959. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(01\)00063-2](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(01)00063-2)
- Altman, B.J., Stine, Z.E., Dang, C.V., 2016. From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 16, 619–634. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.71>
- Alvarez, S.W., Sviderskiy, V.O., Terzi, E.M., Papagiannakopoulos, T., Moreira, A.L., Adams, S., Sabatini, D.M., Birsoy, K., Possemato, R., 2017. NFS1 undergoes positive selection in lung tumours and protects cells from ferroptosis. *Nature* 551, 639–643. <https://doi.org/10.1038/nature24637>
- Argenziano, M., Tortora, C., Paola, A.D., Pota, E., Martino, M.D., Pinto, D.D., Leva, C.D., Rossi, F., 2021. Eltrombopag and its iron chelating properties in pediatric acute myeloid leukemia. *Oncotarget* 12, 1377–1387. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.28000>
- Argüello, R.J., Combes, A.J., Char, R., Gigan, J.-P., Baaziz, A.I., Bousiquot, E., Camosseto, V., Samad, B., Tsui, J., Yan, P., Boissonneau, S., Figarella-Branger, D., Gatti, E., Tabouret, E., Krummel, M.F., Pierre, P., 2020. SCENITH: A Flow Cytometry-Based Method to Functionally Profile Energy Metabolism with Single-Cell Resolution. *Cell Metabolism* 32, 1063-1075.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.11.007>
- Ast, T., Meisel, J.D., Patra, S., Wang, H., Grange, R.M.H., Kim, S.H., Calvo, S.E., Orefice, L.L., Nagashima, F., Ichinose, F., Zapol, W.M., Ruvkun, G., Barondeau, D.P., Mootha, V.K., 2019. Hypoxia Rescues Frataxin Loss by Restoring Iron Sulfur Cluster Biogenesis. *Cell* 177, 1507-1521.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.045>
- Azzam, M.E., Algranati, I.D., 1973. Mechanism of Puromycin Action: Fate of Ribosomes after Release of Nascent Protein Chains from Polysomes. *PNAS* 70, 3866–3869. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.12.3866>
- Bertoli, S., Paubelle, E., Bérard, E., Saland, E., Thomas, X., Tavitian, S., Larcher, M.-V., Vergez, F., Delabesse, E., Sarry, A., Huguet, F., Larrue, C., Bosc, C., Farge, T., Sarry, J.E., Michallet, M., Récher, C., 2019. Ferritin heavy/light chain (FTH1/FTL) expression, serum ferritin levels, and their functional as well as prognostic roles in acute myeloid leukemia. *European Journal of Haematology* 102, 131–142. <https://doi.org/10.1111/ejh.13183>
- Biswas, S.K., 2015. Metabolic Reprogramming of Immune Cells in Cancer Progression. *Immunity* 43, 435–449. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.09.001>
- Bock, F.J., Tait, S.W.G., 2020. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 85–100. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0173-8>
- Boettcher, S., Miller, P.G., Sharma, R., McConkey, M., Leventhal, M., Krivtsov, A.V., Giacomelli, A.O., Wong, W., Kim, J., Chao, S., Kurppa, K.J., Yang, X., Milenkowic, K., Piccioni, F., Root, D.E., Rücker, F.G., Flamand, Y., Neuberg, D., Lindsley, R.C., Jänne, P.A., Hahn, W.C., Jacks, T., Döhner, H., Armstrong, S.A., Ebert, B.L., 2019. A dominant-negative effect drives selection of TP53 missense mutations in myeloid malignancies. *Science* 365, 599–604. <https://doi.org/10.1126/science.aax3649>
- Bonora, M., Wieckowski, M.R., Chinopoulos, C., Kepp, O., Kroemer, G., Galluzzi, L., Pinton, P., 2015. Molecular mechanisms of cell death: central implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Oncogene* 34, 1475–1486. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.96>
- Bosc, C., Broin, N., Fanjul, M., Saland, E., Farge, T., Courdy, C., Batut, A., Masoud, R., Larrue, C., Skuli, S., Espagnol, N., Pagès, J.-C., Carrier, A., Bost, F., Bertrand-Michel, J., Tamburini, J., Récher, C., Bertoli, S., Mansat-De Mas, V., Manenti, S., Sarry, J.-E., Joffre, C., 2020. Autophagy regulates fatty acid availability for oxidative phosphorylation through mitochondria-endoplasmic reticulum contact sites. *Nat Commun* 11, 4056. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17882-2>
- Bosc, C., Saland, E., Bousard, A., Gadaud, N., Sabatier, M., Cognet, G., Farge, T., Boet, E., Gota-nègre, M., Aroua, N., Mouchel, P.-L., Polley, N., Larrue, C., Kaphan, E., Picard, M., Sahal, A., Jarrou, L., Tosolini, M., Rambow, F., Cabon, F., Nicot, N., Poillet-Perez, L., Wang, Y., Su, X.,

- Fovez, Q., Kluza, J., Argüello, R.J., Mazzotti, C., Avet-Loiseau, H., Vergez, F., Tamburini, J., Fournié, J.-J., Tiong, I.S., Wei, A.H., Kaoma, T., Marine, J.-C., Récher, C., Stuani, L., Joffre, C., Sarry, J.-E., 2021. Mitochondrial inhibitors circumvent adaptive resistance to venetoclax and cytarabine combination therapy in acute myeloid leukemia. *Nat Cancer* 2, 1204–1223. <https://doi.org/10.1038/s43018-021-00264-y>
- Bose, P., Vachhani, P., Cortes, J.E., 2017. Treatment of Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia. *Curr Treat Options Oncol* 18, 17. <https://doi.org/10.1007/s11864-017-0456-2>
- Braymer, J.J., Freibert, S.A., Rakwalska-Bange, M., Lill, R., 2021. Mechanistic concepts of iron-sulfur protein biogenesis in Biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1868, 118863. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118863>
- Breuer, W., Shvartsman, M., Cabantchik, Z.I., 2008. Intracellular labile iron. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40, 350–354. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.03.010>
- Burnett, A., Wetzler, M., Löwenberg, B., 2011. Therapeutic Advances in Acute Myeloid Leukemia. *JCO* 29, 487–494. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.30.1820>
- Bystrom, L.M., Rivella, S., 2015. Cancer cells with irons in the fire. *Free Radical Biology and Medicine* 79, 337–342. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.035>
- Caiado, F., Manz, M.G., 2022. A microbiome-macrophage-iron axis guides stressed hematopoietic stem cell fate. *Cell Stem Cell* 29, 177–179. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2022.01.009>
- Caiado, F., Pietras, E.M., Manz, M.G., 2021. Inflammation as a regulator of hematopoietic stem cell function in disease, aging, and clonal selection. *Journal of Experimental Medicine* 218, e20201541. <https://doi.org/10.1084/jem.20201541>
- Callens, C., Coulon, S., Naudin, J., Radford-Weiss, I., Boissel, N., Raffoux, E., Wang, P.H.M., Agarwal, S., Tamouza, H., Paubelle, E., Asnafi, V., Ribeil, J.-A., Dessen, P., Canioni, D., Chandesris, O., Rubio, M.T., Beaumont, C., Benhamou, M., Dombret, H., Macintyre, E., Monteiro, R.C., Moura, I.C., Hermine, O., 2010. Targeting iron homeostasis induces cellular differentiation and synergizes with differentiating agents in acute myeloid leukemia. *J Exp Med* 207, 731–750. <https://doi.org/10.1084/jem.20091488>
- Campbell, N.K., Fitzgerald, H.K., Dunne, A., 2021. Regulation of inflammation by the antioxidant haem oxygenase 1. *Nat Rev Immunol* 21, 411–425. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00491-x>
- Canzoneri, J.C., Oyelere, A.K., 2008. Interaction of anthracyclines with iron responsive element mRNAs. *Nucleic Acids Research* 36, 6825–6834. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn774>
- Carracedo, A., Cantley, L.C., Pandolfi, P.P., 2013. Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nat Rev Cancer* 13, 227–232. <https://doi.org/10.1038/nrc3483>
- Carter, J.L., Hege, K., Yang, J., Kalpage, H.A., Su, Y., Edwards, H., Hüttemann, M., Taub, J.W., Ge, Y., 2020. Targeting multiple signaling pathways: the new approach to acute myeloid leukemia therapy. *Sig Transduct Target Ther* 5, 1–29. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00361-x>
- Casey, J.L., Hentze, M.W., Koeller, D.M., Caughman, W., Rouault, T.A., Klausner, R.D., Harford, J.B., 1988. Iron-Responsive Elements: Regulatory RNA Sequences that Control mRNA Levels and Translation. *Science, New Series* 240, 924–928.
- Cazzola, M., Invernizzi, R., Bergamaschi, G., Levi, S., Corsi, B., Travaglino, E., Rolandi, V., Biasiotto, G., Drysdale, J., Arosio, P., 2003. Mitochondrial ferritin expression in erythroid cells from patients with sideroblastic anemia. *Blood* 101, 1996–2000. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-07-2006>
- Çelik, H., Lindblad, K.E., Popescu, B., Gui, G., Goswami, M., Valdez, J., DeStefano, C., Lai, C., Thompson, J., Ghannam, J.Y., Fantoni, G., Biancotto, A., Candia, J., Cheung, F., Sukumar, G., Dalgard, C.L., Smith, R.H., Larochelle, A., Dillon, L.W., Hourigan, C.S., 2020. Highly multiplexed proteomic assessment of human bone marrow in acute myeloid leukemia. *Blood Advances* 4, 367–379. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019001124>
- Chawla, A., Nguyen, K.D., Goh, Y.P.S., 2011. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 11, 738–749. <https://doi.org/10.1038/nri3071>
- Chen, J., Bardes, E.E., Aronow, B.J., Jegga, A.G., 2009. ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic Acids Research* 37, W305–W311. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp427>

- Chen, X., Yu, C., Kang, R., Tang, D., 2020. Iron Metabolism in Ferroptosis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8, 1089. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.590226>
- Chen, Y., Fan, Z., Yang, Y., Gu, C., 2019. Iron metabolism and its contribution to cancer (Review). *International Journal of Oncology* 54, 1143–1154. <https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4720>
- Chipuk, J.E., Bouchier-Hayes, L., Green, D.R., 2006. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ* 13, 1396–1402. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401963>
- de Heer, E.C., Jalving, M., Harris, A.L., n.d. HIFs, angiogenesis, and metabolism: elusive enemies in breast cancer. *J Clin Invest* 130, 5074–5087. <https://doi.org/10.1172/JCI137552>
- DeBerardinis, R.J., Chandel, N.S., 2020. We need to talk about the Warburg effect. *Nat Metab* 2, 127–129. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0172-2>
- DeBerardinis, R.J., Chandel, N.S., 2016. Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances* 2, e1600200. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600200>
- Di Paola, A., Palumbo, G., Merli, P., Argenziano, M., Tortora, C., Strocchio, L., Roberti, D., Santoro, C., Perrotta, S., Rossi, F., 2020. Effects of Eltrombopag on In Vitro Macrophage Polarization in Pediatric Immune Thrombocytopenia. *Int J Mol Sci* 22, E97. <https://doi.org/10.3390/ijms22010097>
- Di Paola, A., Palumbo, G., Tortora, C., Argenziano, M., Catanoso, M., Di Leva, C., Ceglie, G., Perrotta, S., Locatelli, F., Rossi, F., 2022. Eltrombopag in paediatric immune thrombocytopenia: Iron metabolism modulation in mesenchymal stromal cells. *British Journal of Haematology* 197, 110–119. <https://doi.org/10.1111/bjh.18012>
- Dickinson, M., Cherif, H., Fenaux, P., Mittelman, M., Verma, A., Portella, M.S.O., Burgess, P., Ramos, P.M., Choi, J., Platzbecker, U., on behalf of the SUPPORT study investigators, 2018. Azacitidine with or without eltrombopag for first-line treatment of intermediate- or high-risk MDS with thrombocytopenia. *Blood* 132, 2629–2638. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-06-855221>
- DiNardo, C.D., Tiong, I.S., Quaglieri, A., MacRaid, S., Loghavi, S., Brown, F.C., Thijssen, R., Pomilio, G., Ivey, A., Salmon, J.M., Glytsou, C., Fleming, S.A., Zhang, Q., Ma, H., Patel, K.P., Kornblau, S.M., Xu, Z., Chua, C.C., Chen, X., Blombery, P., Flensburg, C., Cummings, N., Aifantis, I., Kantarjian, H., Huang, D.C.S., Roberts, A.W., Majewski, I.J., Konopleva, M., Wei, A.H., 2020. Molecular patterns of response and treatment failure after frontline venetoclax combinations in older patients with AML. *Blood* 135, 791–803. <https://doi.org/10.1182/blood.2019003988>
- Ding, L., Liang, G., Yao, Z., Zhang, J., Liu, R., Chen, H., Zhou, Y., Wu, H., Yang, B., He, Q., 2015. Metformin prevents cancer metastasis by inhibiting M2-like polarization of tumor associated macrophages. *Oncotarget* 6, 36441–36455. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5541>
- Dixon, S.J., Lemberg, K.M., Lamprecht, M.R., Skouta, R., Zaitsev, E.M., Gleason, C.E., Patel, D.N., Bauer, A.J., Cantley, A.M., Yang, W.S., Morrison, B., Stockwell, B.R., 2012. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell* 149, 1060–1072. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>
- Döhner, H., Estey, E., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F.R., Büchner, T., Dombret, H., Ebert, B.L., Fenaux, P., Larson, R.A., Levine, R.L., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G.J., Sanz, M., Sierra, J., Tallman, M.S., Tien, H.-F., Wei, A.H., Löwenberg, B., Bloomfield, C.D., 2017. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 129, 424–447. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-733196>
- Drexler, B., Passweg, J., 2021. Current evidence and the emerging role of eltrombopag in severe aplastic anemia. *Therapeutic Advances in Hematology* 12, 2040620721998126. <https://doi.org/10.1177/2040620721998126>
- Ducamp, S., Fleming, M.D., 2019. The molecular genetics of sideroblastic anemia. *Blood* 133, 59–69. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-08-815951>
- Engblom, C., Pflirschke, C., Pittet, M.J., 2016. The role of myeloid cells in cancer therapies. *Nat Rev Cancer* 16, 447–462. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.54>
- Farge, T., Saland, E., de Toni, F., Aroua, N., Hosseini, M., Perry, R., Bosc, C., Sugita, M., Stuani, L., Fraise, M., Scotland, S., Larrue, C., Boutzen, H., Féliu, V., Nicolau-Travers, M.-L., Cassant-Sourdy, S., Broin, N., David, M., Serhan, N., Sarry, A., Tavitian, S., Kaoma, T., Vallar, L.,

- Iacovoni, J., Linares, L.K., Montersino, C., Castellano, R., Griessinger, E., Collette, Y., Duchamp, O., Barreira, Y., Hirsch, P., Palama, T., Gales, L., Delhommeau, F., Garmy-Susini, B.H., Portais, J.-C., Vergez, F., Selak, M., Danet-Desnoyers, G., Carroll, M., Récher, C., Sarry, J.-E., 2017. Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. *Cancer Discov* 7, 716–735. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0441>
- Frey, N., Jang, J.H., Szer, J., Illés, Á., Kim, H.-J., Ram, R., Chong, B.H., Rowe, J.M., Borisenkova, E., Liesveld, J., Winer, E.S., Cherfi, A., Aslanis, V., Ghaznawi, F., Strickland, S., 2019. Eltrombopag treatment during induction chemotherapy for acute myeloid leukaemia: a randomised, double-blind, phase 2 study. *The Lancet Haematology* 6, e122–e131. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(18\)30231-X](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(18)30231-X)
- Gallipoli, P., Giotopoulos, G., Tzelepis, K., Costa, A.S.H., Vohra, S., Medina-Perez, P., Basheer, F., Marando, L., Di Lisio, L., Dias, J.M.L., Yun, H., Sasca, D., Horton, S.J., Vassiliou, G., Frezza, C., Huntly, B.J.P., 2018. Glutaminolysis is a metabolic dependency in FLT3ITD acute myeloid leukemia unmasked by FLT3 tyrosine kinase inhibition. *Blood* 131, 1639–1653. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-12-820035>
- Gammella, E., Buratti, P., Cairo, G., Recalcati, S., 2014. Macrophages: central regulators of iron balance. *Metallomics* 6, 1336–1345. <https://doi.org/10.1039/C4MT00104D>
- Garciaz, S., Guirguis, A.A., Muller, S., Brown, F.C., Chan, Y.-C., Motazedian, A., Rowe, C.L., Kuzich, J.A., Chan, K.L., Tran, K., Smith, L., MacPherson, L., Liddicoat, B., Lam, E.Y.N., Caneque, T., Burr, M.L., Litalien, V., Pomilio, G., Poplineau, M., Duprez, E., Dawson, S.-J., Ramm, G., Cox, A.G., Brown, K.K., Huang, D.C.S., Wei, A.H., McArthur, K., Rodriguez, R., Dawson, M.A., 2021. Pharmacological reduction of mitochondrial iron triggers a non-canonical BAX/BAK dependent cell death. *Cancer Discov* candisc.0522.2021. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-0522>
- Gasparetto, M., Pei, S., Minhajuddin, M., Stevens, B., Smith, C.A., Seligman, P., 2019. Low ferroportin expression in AML is correlated with good risk cytogenetics, improved outcomes and increased sensitivity to chemotherapy. *Leukemia Research* 80, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2019.02.011>
- Ghanima, W., Cooper, N., Rodeghiero, F., Godeau, B., Bussel, J.B., 2019. Thrombopoietin receptor agonists: ten years later. *1* 104, 1112–1123. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.212845>
- Ginhoux, F., Jung, S., 2014. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol* 14, 392–404. <https://doi.org/10.1038/nri3671>
- Gorelick, A.N., Kim, M., Chatila, W.K., La, K., Hakimi, A.A., Berger, M.F., Taylor, B.S., Gammage, P.A., Reznik, E., 2021. Respiratory complex and tissue lineage drive recurrent mutations in tumour mtDNA. *Nat Metab* 3, 558–570. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00378-8>
- 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., Dang, L., Fantin, V.R., Mak, T.W., 2010. Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *Journal of Experimental Medicine* 207, 339–344. <https://doi.org/10.1084/jem.20092506>
- Guaraldo, M., Santambrogio, P., Rovelli, E., Di Savino, A., Saglio, G., Cittaro, D., Roetto, A., Levi, S., 2016. Characterization of human mitochondrial ferritin promoter: identification of transcription factors and evidences of epigenetic control. *Sci Rep* 6, 33432. <https://doi.org/10.1038/srep33432>
- Hackl, H., Astanina, K., Wieser, R., 2017. Molecular and genetic alterations associated with therapy resistance and relapse of acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol* 10, 51. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0416-0>
- Hanahan, D., 2022. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery* 12, 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

- Heasman, S.-A., Zaitseva, L., Bowles, K.M., Rushworth, S.A., MacEwan, D.J., 2011. Protection of acute myeloid leukaemia cells from apoptosis induced by front-line chemotherapeutics is mediated by haem oxygenase-1. *Oncotarget* 2, 658–668. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.321>
- Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U., Galy, B., Camaschella, C., 2010. Two to Tango: Regulation of Mammalian Iron Metabolism. *Cell* 142, 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.028>
- Hernández-Gallardo, A.K., Missirlis, F., 2020. Cellular iron sensing and regulation: Nuclear IRP1 extends a classic paradigm. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1867, 118705. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118705>
- Hider, R.C., Hoffbrand, A.V., 2018. The Role of Deferiprone in Iron Chelation. *N Engl J Med* 379, 2140–2150. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1800219>
- Hirota, K., 2019. An intimate crosstalk between iron homeostasis and oxygen metabolism regulated by the hypoxia-inducible factors (HIFs). *Free Radical Biology and Medicine, Iron as Soul of Life on Earth Revisited: From Chemical Reaction, Ferroptosis to Therapeutics* 133, 118–129. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.07.018>
- Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D.B., Johnston, P.G., 2013. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* 13, 714–726. <https://doi.org/10.1038/nrc3599>
- Huang, Y., Shen, Z., Wu, C., Teng, Y., Liao, C., Kao, C., Chen, L., Lin, C., Tsai, T., 2018. Comparative proteomic profiling reveals a role for Cisd2 in skeletal muscle aging. *Aging Cell* 17, e12705. <https://doi.org/10.1111/accel.12705>
- Ibrahim, O., O'Sullivan, J., 2020. Iron chelators in cancer therapy. *Biometals* 33, 201–215. <https://doi.org/10.1007/s10534-020-00243-3>
- Janssen, R.C., Boyle, K.E., 2019. Microplate Assays for Spectrophotometric Measurement of Mitochondrial Enzyme Activity, in: D'Alessandro, A. (Ed.), *High-Throughput Metabolomics: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*. Springer, New York, NY, pp. 355–368. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9236-2_22
- Jiang, L., Kon, N., Li, T., Wang, S.-J., Su, T., Hibshoosh, H., Baer, R., Gu, W., 2015. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. *Nature* 520, 57–62. <https://doi.org/10.1038/nature14344>
- Kalota, A., Selak, M.A., Garcia-Cid, L.A., Carroll, M., 2015. Eltrombopag Modulates Reactive Oxygen Species and Decreases Acute Myeloid Leukemia Cell Survival. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126691>
- Kantarjian, H., Short, N.J., DiNardo, C., Stein, E.M., Daver, N., Perl, A.E., Wang, E.S., Wei, A., Tallman, M., 2021. Harnessing the benefits of available targeted therapies in acute myeloid leukaemia. *The Lancet Haematology* 0. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(21\)00270-2](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(21)00270-2)
- Karmi, O., Sohn, Y.-S., Zandalinas, S.I., Rowland, L., King, S.D., Nechushtai, R., Mittler, R., 2021. Disrupting Cisd2 function in cancer cells primarily impacts mitochondrial labile iron levels and triggers TXNIP expression. *Free Radical Biology and Medicine* 176, 92–104. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.09.013>
- Kwok, J.C., Richardson, D.R., 2002. Unexpected anthracycline-mediated alterations in iron-regulatory protein-RNA-binding activity: the iron and copper complexes of anthracyclines decrease RNA-binding activity. *Mol Pharmacol* 62, 888–900. <https://doi.org/10.1124/mol.62.4.888>
- Lacroix, M., Riscal, R., Arena, G., Linares, L.K., Le Cam, L., 2020. Metabolic functions of the tumor suppressor p53: Implications in normal physiology, metabolic disorders, and cancer. *Molecular Metabolism, Cancer Metabolism* 33, 2–22. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.10.002>
- Lavin, Y., Mortha, A., Rahman, A., Merad, M., 2015. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol* 15, 731–744. <https://doi.org/10.1038/nri3920>
- Leimberg, M.J., Prus, E., Konijn, A.M., Fibach, E., 2008. Macrophages function as a ferritin iron source for cultured human erythroid precursors. *Journal of Cellular Biochemistry* 103, 1211–1218. <https://doi.org/10.1002/jcb.21499>
- Lill, R., 2020. From the discovery to molecular understanding of cellular iron-sulfur protein biogenesis. *Biological Chemistry* 401, 855–876. <https://doi.org/10.1515/hsz-2020-0117>
- Lill, R., Freibert, S.-A., 2020. Mechanisms of Mitochondrial Iron-Sulfur Protein Biogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 89, 471–499. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111540>

- Lill, R., Hoffmann, B., Molik, S., Pierik, A.J., Rietzschel, N., Stehling, O., Uzarska, M.A., Webert, H., Wilbrecht, C., Mühlenhoff, U., 2012. The role of mitochondria in cellular iron–sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1823, 1491–1508. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.05.009>
- Liu, J., Zhang, C., Hu, W., Feng, Z., 2019. Tumor suppressor p53 and metabolism. *Journal of Molecular Cell Biology* 11, 284–292. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjy070>
- Lopes, M., Duarte, T.L., Teles, M.J., Mosteo, L., Chacim, S., Aguiar, E., Pereira-Reis, J., Oliveira, M., Silva, A.M.N., Gonçalves, N., Martins, G., Kong, I.Y., Zethoven, M., Vervoort, S., Martins, S., Quintela, M., Hawkins, E.D., Trigo, F., Guimarães, J.T., Mariz, J.M., Porto, G., Duarte, D., 2021. Loss of erythroblasts in acute myeloid leukemia causes iron redistribution with clinical implications. *Blood Advances* 5, 3102–3112. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021004373>
- Mantovani, A., Marchesi, F., Malesci, A., Laghi, L., Allavena, P., 2017. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol* 14, 399–416. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.217>
- Martinez-Outschoorn, U.E., Peiris-Pagés, M., Pestell, R.G., Sotgia, F., Lisanti, M.P., 2017. Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat Rev Clin Oncol* 14, 11–31. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.60>
- Maryanovich, M., Ito, K., 2022. CD36-Mediated Fatty Acid Oxidation in Hematopoietic Stem Cells Is a Novel Mechanism of Emergency Hematopoiesis in Response to Infection. *Immunometabolism* 4. <https://doi.org/10.20900/immunometab20220008>
- Matoba, S., Kang, J.-G., Patino, W.D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilova, O., Hurley, P.J., Bunz, F., Hwang, P.M., 2006. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 312, 1650–1653. <https://doi.org/10.1126/science.1126863>
- Mehla, K., Singh, P.K., 2019. Metabolic Regulation of Macrophage Polarization in Cancer. *Trends in Cancer* 5, 822–834. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.10.007>
- Mehta, M.M., Weinberg, S.E., Chandel, N.S., 2017. Mitochondrial control of immunity: beyond ATP. *Nat Rev Immunol* 17, 608–620. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.66>
- Méndez-Ferrer, S., Bonnet, D., Steensma, D.P., Hasserjian, R.P., Ghobrial, I.M., Gribben, J.G., Andreeff, M., Krause, D.S., 2020. Bone marrow niches in haematological malignancies. *Nat Rev Cancer* 20, 285–298. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0245-2>
- Mills, E.L., Kelly, B., Logan, A., Costa, A.S.H., Varma, M., Bryant, C.E., Tourlomousis, P., Däbritz, J.H.M., Gottlieb, E., Latorre, I., Corr, S.C., McManus, G., Ryan, D., Jacobs, H.T., Szibor, M., Xavier, R.J., Braun, T., Frezza, C., Murphy, M.P., O'Neill, L.A., 2016. Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages 28.
- Moschoi, R., Imbert, V., Nebout, M., Chiche, J., Mary, D., Prebet, T., Saland, E., Castellano, R., Pouyet, L., Collette, Y., Vey, N., Chabannon, C., Recher, C., Sarry, J.-E., Alcor, D., Peyron, J.-F., Griessinger, E., 2016. Protective mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to acute myeloid leukemic cells during chemotherapy. *Blood* 128, 253–264. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-07-655860>
- Müller, S., Sindikubwabo, F., Cañeque, T., Lafon, A., Versini, A., Lombard, B., Loew, D., Wu, T.-D., Ginestier, C., Charafe-Jauffret, E., Durand, A., Vallot, C., Baulande, S., Servant, N., Rodriguez, R., 2020. CD44 regulates epigenetic plasticity by mediating iron endocytosis. *Nature Chemistry* 12, 929–938. <https://doi.org/10.1038/s41557-020-0513-5>
- Mussai, F., De Santo, C., Abu-Dayyeh, I., Booth, S., Quek, L., McEwen-Smith, R.M., Qureshi, A., Dazzi, F., Vyas, P., Cerundolo, V., 2013. Acute myeloid leukemia creates an arginase-dependent immunosuppressive microenvironment. *Blood* 122, 749–758. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-480129>
- Odegaard, J.I., Chawla, A., 2013. Pleiotropic actions of insulin resistance and inflammation in metabolic homeostasis. *Science* 339, 172–177. <https://doi.org/10.1126/science.1230721>
- Papaemmanuil, E., Paschka, P., Bolli, N., Ganly, P., Raine, K., Jones, D.R., Teague, J.W., Butler, A.P., Greaves, M.F., Ganser, A., Campbell, P.J., 2016. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *n engl j med* 13.
- Pereira, M., Chen, T.-D., Buang, N., Olona, A., Ko, J.-H., Predecki, M., Costa, A.S.H., Nikitopoulou, E., Tronci, L., Pusey, C.D., Cook, H.T., McAdoo, S.P., Frezza, C., Behmoaras, J., 2019. Acute

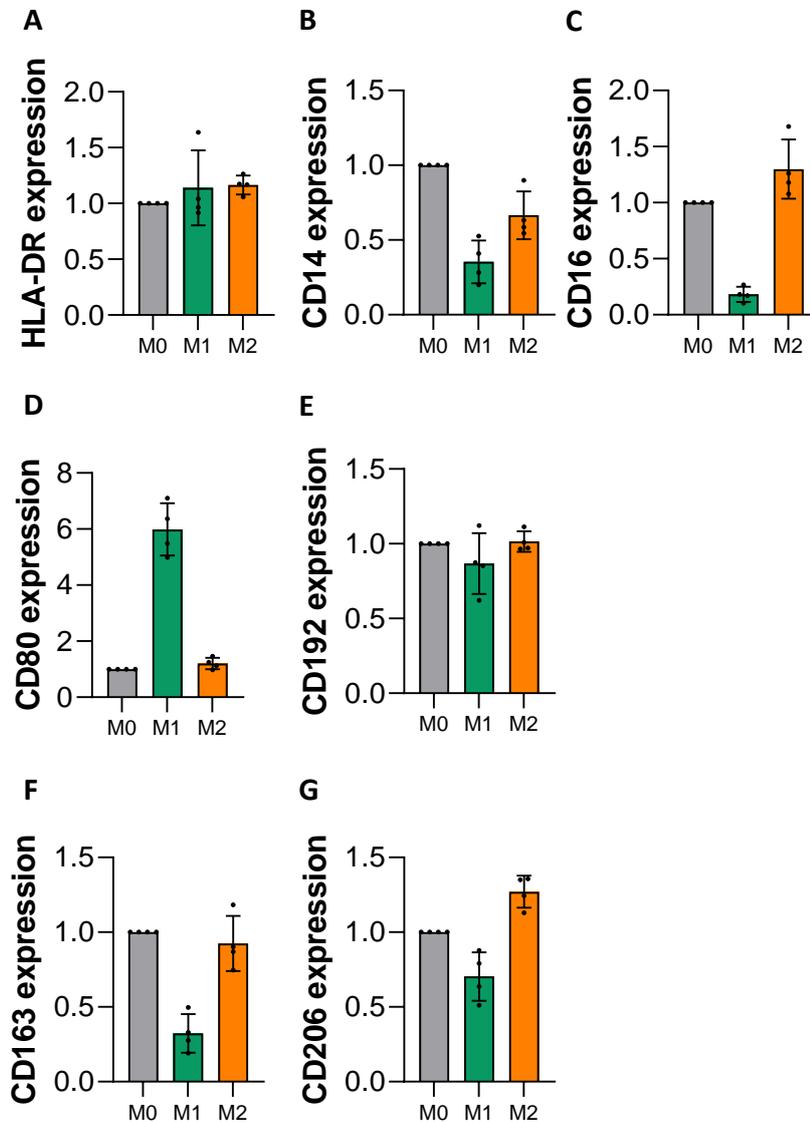
- Iron Deprivation Reprograms Human Macrophage Metabolism and Reduces Inflammation In Vivo. *Cell Reports* 28, 498-511.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.039>
- Pradhan, P., Vijayan, V., Gueler, F., Immenschuh, S., 2020. Interplay of Heme with Macrophages in Homeostasis and Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 740. <https://doi.org/10.3390/ijms21030740>
- Rackham, O., Filipovska, A., 2022. Organization and expression of the mammalian mitochondrial genome. *Nat Rev Genet* 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00480-x>
- Ragaini, S., Wagner, S., Marconi, G., Parisi, S., Sartor, C., Nanni, J., Cristiano, G., Talami, A., Olivi, M., Ocadlikova, D., Ciciarello, M., Corradi, G., Ottaviani, E., Papayannidis, C., Paolini, S., Vadakekolathu, J., Cavo, M., Rutella, S., Curti, A., 2021. An IDO1-related immune gene signature predicts overall survival in acute myeloid leukemia. *Blood Adv* bloodadvances.2021004878. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021004878>
- Raghavan, S., Winter, P.S., Navia, A.W., Williams, H.L., DenAdel, A., Lowder, K.E., Galvez-Reyes, J., Kalekar, R.L., Mulugeta, N., Kapner, K.S., Raghavan, M.S., Borah, A.A., Liu, N., Väyrynen, S.A., Costa, A.D., Ng, R.W.S., Wang, J., Hill, E.K., Ragon, D.Y., Brais, L.K., Jaeger, A.M., Spurr, L.F., Li, Y.Y., Cherniack, A.D., Booker, M.A., Cohen, E.F., Tolstorukov, M.Y., Wakiro, I., Rotem, A., Johnson, B.E., McFarland, J.M., Sicinska, E.T., Jacks, T.E., Sullivan, R.J., Shapiro, G.I., Clancy, T.E., Perez, K., Rubinson, D.A., Ng, K., Cleary, J.M., Crawford, L., Manalis, S.R., Nowak, J.A., Wolpin, B.M., Hahn, W.C., Aguirre, A.J., Shalek, A.K., 2021. Microenvironment drives cell state, plasticity, and drug response in pancreatic cancer. *Cell* 184, 6119-6137.e26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.11.017>
- Récher, C., 2021. Clinical Implications of Inflammation in Acute Myeloid Leukemia. *Frontiers in Oncology* 11.
- Reusser, N.M., Dalton, H.J., Pradeep, S., Gonzalez-Villasana, V., Jennings, N.B., Vasquez, H.G., Wen, Y., Rupaimoole, R., Nagaraja, A.S., Gharpure, K., Miyake, T., Huang, J., Hu, W., Lopez-Berestein, G., Sood, A.K., 2014. Clodronate inhibits tumor angiogenesis in mouse models of ovarian cancer. *Cancer Biol Ther* 15, 1061–1067. <https://doi.org/10.4161/cbt.29184>
- Roth, M., Will, B., Simkin, G., Narayanagari, S., Barreyro, L., Bartholdy, B., Tamari, R., Mitsiades, C.S., Verma, A., Steidl, U., 2012. Eltrombopag inhibits the proliferation of leukemia cells via reduction of intracellular iron and induction of differentiation. *Blood* 120, 386–394. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-399667>
- Saito, K., Zhang, Q., Yang, H., Yamatani, K., Ai, T., Ruvolo, V., Baran, N., Cai, T., Ma, H., Jacamo, R., Kuruvilla, V., Imoto, J., Kinjo, S., Ikeo, K., Moriya, K., Suzuki, K., Miida, T., Kim, Y.-M., Vellano, C.P., Andreeff, M., Marszalek, J.R., Tabe, Y., Konopleva, M., 2021. Exogenous mitochondrial transfer and endogenous mitochondrial fission facilitate AML resistance to OxPhos inhibition. *Blood Advances* 5, 4233–4255. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020003661>
- Saland, E., Boutzen, H., Castellano, R., Pouyet, L., Griessinger, E., Larrue, C., de Toni, F., Scotland, S., David, M., Danet-Desnoyers, G., Vergez, F., Barreira, Y., Collette, Y., Récher, C., Sarry, J.-E., 2015. A robust and rapid xenograft model to assess efficacy of chemotherapeutic agents for human acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J* 5, e297. <https://doi.org/10.1038/bcj.2015.19>
- Salerno, L., Romeo, G., Modica, M.N., Amata, E., Sorrenti, V., Barbagallo, I., Pittalà, V., 2017. Heme oxygenase-1: A new druggable target in the management of chronic and acute myeloid leukemia. *European Journal of Medicinal Chemistry, Current advances in cancer research: Therapeutics, Targets, and Chemical Biology* 142, 163–178. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.031>
- Santambrogio, P., Biasiotto, G., Sanvito, F., Olivieri, S., Arosio, P., Levi, S., 2007. Mitochondrial Ferritin Expression in Adult Mouse Tissues. *J Histochem Cytochem.* 55, 1129–1137. <https://doi.org/10.1369/jhc.7A7273.2007>
- Sarry, J.-E., Murphy, K., Perry, R., Sanchez, P.V., Secreto, A., Keefer, C., Swider, C.R., Strzelecki, A.-C., Cavelier, C., Récher, C., Mansat-De Mas, V., Delabesse, E., Danet-Desnoyers, G., Carroll, M., 2011. Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2R γ c-deficient mice. *J Clin Invest* 121, 384–395. <https://doi.org/10.1172/JCI41495>

- Sharon, D., Cathelin, S., Mirali, S., Trani, J.M.D., Yanofsky, D.J., Keon, K.A., Rubinstein, J.L., Schimmer, A.D., Ketela, T., Chan, S.M., 2019. Inhibition of mitochondrial translation overcomes venetoclax resistance in AML through activation of the integrated stress response. *Science Translational Medicine* 11. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aax2863>
- Sheftel, A.D., Zhang, A.-S., Brown, C., Shirihai, O.S., Ponka, P., 2007. Direct interorganellar transfer of iron from endosome to mitochondrion. *Blood* 110, 125–132. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-068148>
- Short, N.J., Konopleva, M., Kadia, T.M., Borthakur, G., Ravandi, F., DiNardo, C.D., Daver, N., 2020. Advances in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: New Drugs and New Challenges. *Cancer Discov* 10, 506–525. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-1011>
- Shultz, L.D., Lyons, B.L., Burzenski, L.M., Gott, B., Chen, X., Chaleff, S., Kotb, M., Gillies, S.D., King, M., Mangada, J., Greiner, D.L., Handgretinger, R., 2005. Human Lymphoid and Myeloid Cell Development in NOD/LtSz-scid IL2R γ null Mice Engrafted with Mobilized Human Hemopoietic Stem Cells. *The Journal of Immunology* 174, 6477–6489. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.10.6477>
- Soares, M.P., Hamza, I., 2016. Macrophages and Iron Metabolism. *Immunity* 44, 492–504. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.016>
- Sohoni, S., Ghosh, P., Wang, T., Kalainayakan, S.P., Vidal, C., Dey, S., Konduri, P.C., Zhang, L., 2019. Elevated Heme Synthesis and Uptake Underpin Intensified Oxidative Metabolism and Tumorigenic Functions in Non–Small Cell Lung Cancer Cells. *Cancer Res* 79, 2511–2525. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2156>
- Soki, F.N., Cho, S.W., Kim, Y.W., Jones, J.D., Park, S.I., Koh, A.J., Entezami, P., Daignault-Newton, S., Pienta, K.J., Roca, H., McCauley, L.K., 2015. Bone marrow macrophages support prostate cancer growth in bone. *Oncotarget* 6, 35782–35796. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6042>
- Spitz, A.Z., Zacharioudakis, E., Reyna, D.E., Garner, T.P., Gavathiotis, E., 2021. Eltrombopag directly inhibits BAX and prevents cell death. *Nat Commun* 12, 1134. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21224-1>
- Stambolsky, P., Weisz, L., Shats, I., Klein, Y., Goldfinger, N., Oren, M., Rotter, V., 2006. Regulation of AIF expression by p53. *Cell Death Differ* 13, 2140–2149. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401965>
- Stehling, O., Wilbrecht, C., Lill, R., 2014. Mitochondrial iron–sulfur protein biogenesis and human disease. *Biochimie* 100, 61–77. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.01.010>
- Stuani, L., Sabatier, M., Saland, E., Cognet, G., Poupin, N., Bosc, C., Castelli, F.A., Gales, L., Turtoi, E., Montersino, C., Farge, T., Boet, E., Broin, N., Larrue, C., Baran, N., Cissé, M.Y., Conti, M., Loric, S., Kaoma, T., Hucteau, A., Zavoriti, A., Sahal, A., Mouchel, P.-L., Gotanègre, M., Cassan, C., Fernando, L., Wang, F., Hosseini, M., Chu-Van, E., Le Cam, L., Carroll, M., Selak, M.A., Vey, N., Castellano, R., Fenaille, F., Turtoi, A., Cazals, G., Bories, P., Gibon, Y., Nicolay, B., Ronseaux, S., Marszalek, J.R., Takahashi, K., DiNardo, C.D., Konopleva, M., Pancaldi, V., Collette, Y., Bellvert, F., Jourdan, F., Linares, L.K., Récher, C., Portais, J.-C., Sarry, J.-E., 2021. Mitochondrial metabolism supports resistance to IDH mutant inhibitors in acute myeloid leukemia. *J Exp Med* 218. <https://doi.org/10.1084/jem.20200924>
- Stuani, L., Sabatier, M., Sarry, J.-E., 2019. Exploiting metabolic vulnerabilities for personalized therapy in acute myeloid leukemia. *BMC Biol* 17, 57. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0670-4>
- Stuani, L., Sarry, J.-E., 2020. Microenvironmental Aspartate Preserves Leukemic Cells from Therapy-Induced Metabolic Collapse. *Cell Metabolism* 32, 321–323. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.08.008>
- Sugita, M., Kalota, A., Gewirtz, A.M., Carroll, M., 2013. Eltrombopag inhibition of acute myeloid leukemia cell survival does not depend on c-Mpl expression. *Leukemia* 27, 1207–1210. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.310>
- Tabe, Y., Konopleva, M., 2014. ADVANCES IN UNDERSTANDING THE LEUKEMIA MICROENVIRONMENT. *Br J Haematol* 164, 767–778. <https://doi.org/10.1111/bjh.12725>
- Tang, D., Chen, X., Kroemer, G., 2022. Cuproptosis: a copper-triggered modality of mitochondrial cell death. *Cell Res* 32, 417–418. <https://doi.org/10.1038/s41422-022-00653-7>
- Torti, S.V., Torti, F.M., 2013. Iron and cancer: more ore to be mined. *Nat Rev Cancer* 13, 342–355. <https://doi.org/10.1038/nrc3495>

- Tsvetkov, P., Coy, S., Petrova, B., Dreishpoon, M., Verma, A., Abdusamad, M., Rossen, J., Joesch-Cohen, L., Humeidi, R., Spangler, R.D., Eaton, J.K., Frenkel, E., Kocak, M., Corsello, S.M., Lutsenko, S., Kanarek, N., Santagata, S., Golub, T.R., 2022. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins. *Science* 375, 1254–1261. <https://doi.org/10.1126/science.abf0529>
- Vecchi, C., Montosi, G., Zhang, K., Lamberti, I., Duncan, S.A., Kaufman, R.J., Pietrangelo, A., 2009. ER Stress Controls Iron Metabolism Through Induction of Heparin. *Science* 325, 877–880. <https://doi.org/10.1126/science.1176639>
- Vousden, K.H., Ryan, K.M., 2009. p53 and metabolism. *Nat Rev Cancer* 9, 691–700. <https://doi.org/10.1038/nrc2715>
- Weber, S., Parmon, A., Kurrle, N., Schnütgen, F., Serve, H., 2021. The Clinical Significance of Iron Overload and Iron Metabolism in Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia. *Frontiers in Immunology* 11.
- Weinhouse, S., Warburg, O., Burk, D., Schade, A.L., 1956. On Respiratory Impairment in Cancer Cells. *Science* 124, 267–272. <https://doi.org/10.1126/science.124.3215.267>
- Wells, G., Kennedy, P.T., Dahal, L.N., 2021. Investigating the Role of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review. *Front Immunol* 12, 651687. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.651687>
- Will, B., Kawahara, M., Luciano, J.P., Bruns, I., Parekh, S., Erickson-Miller, C.L., Aivado, M.A., Verma, A., Steidl, U., 2009. Effect of the nonpeptide thrombopoietin receptor agonist Eltrombopag on bone marrow cells from patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* 114, 3899–3908. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-219493>
- Wynn, T.A., Chawla, A., Pollard, J.W., 2013. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496, 445–455. <https://doi.org/10.1038/nature12034>
- Xu, Z.-J., Gu, Y., Wang, C.-Z., Jin, Y., Wen, X.-M., Ma, J.-C., Tang, L.-J., Mao, Z.-W., Qian, J., Lin, J., 2020. The M2 macrophage marker *CD206*: a novel prognostic indicator for acute myeloid leukemia. *Oncol Immunology* 9, 1683347. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1683347>
- Xue, Y., Schmollinger, S., Attar, N., Campos, O.A., Vogelauer, M., Carey, M.F., Merchant, S.S., Kurdistani, S.K., 2017. Endoplasmic reticulum–mitochondria junction is required for iron homeostasis. *J Biol Chem* 292, 13197–13204. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.784249>
- Yang, Z., Wang, Y., Zhang, Y., He, X., Zhong, C.-Q., Ni, H., Chen, X., Liang, Y., Wu, J., Zhao, S., Zhou, D., Han, J., 2018. RIP3 targets pyruvate dehydrogenase complex to increase aerobic respiration in TNF-induced necroptosis. *Nat Cell Biol* 20, 186–197. <https://doi.org/10.1038/s41556-017-0022-y>
- Yoon, T., Cowan, J.A., 2004. Frataxin-mediated Iron Delivery to Ferrochelatase in the Final Step of Heme Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 279, 25943–25946. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400107200>
- YU, M., WANG, J., MA, D., CHEN, S., LIN, X., FANG, Q., ZHE, N., 2015. HO-1, RET and PML as possible markers for risk stratification of acute myelocytic leukemia and prognostic evaluation. *Oncol Lett* 10, 3137–3144. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3644>
- Zhang, C., 2014. Essential functions of iron-requiring proteins in DNA replication, repair and cell cycle control. *Protein Cell* 5, 750–760. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0083-7>
- Zhang, S., Pan, C., Shang, Q., Wang, W., Hu, T., Liu, P., Chen, S., Wang, J., Fang, Q., 2021. Over-expressed mitogen-and stress-activated protein kinase 1 promotes the resistance of cytarabine in acute myeloid leukemia through brahma related gene 1-mediated upregulation of heme oxygenase-1. *European Journal of Pharmacology* 174722. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174722>
- Zhang, T., Sun, L., Hao, Y., Suo, C., Shen, S., Wei, H., Ma, W., Zhang, P., Wang, T., Gu, X., Li, S.-T., Chen, Z., Yan, R., Zhang, Y., Cai, Y., Zhou, R., Jia, W., Huang, F., Gao, P., Zhang, H., 2022. ENO1 suppresses cancer cell ferroptosis by degrading the mRNA of iron regulatory protein 1. *Nat Cancer* 3, 75–89. <https://doi.org/10.1038/s43018-021-00299-1>
- Zhu, J., Thompson, C.B., 2019. Metabolic regulation of cell growth and proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 436–450. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0123-5>

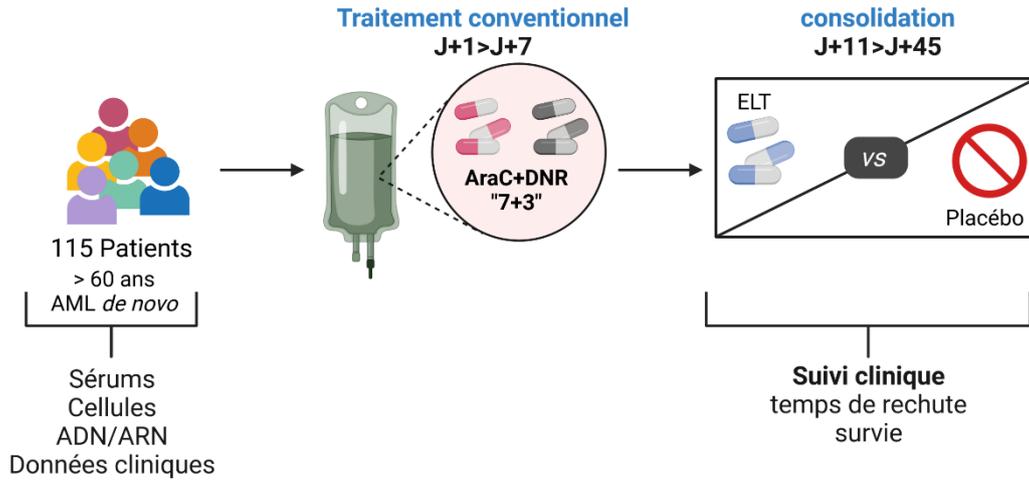
Annexes

Annexe 1 : Différenciation des macrophages in vitro, expression des marqueurs



Phénotypage des macrophages in vitro. Les macrophages obtenus par différenciation in vitro sont caractérisés par l'expression de marqueurs en cytométrie de flux. Les données suivant le profil induit représentent l'intensité de fluorescence du marqueur. (A) HLA-DR, (B) CD14, (C) CD16. Les marqueurs des macrophages M1 (D) CD80 et (E) CD192) et ceux des macrophages M2 (F) CD163, (G) CD206.

Annexe 2 : Essai clinique EPAG-2015



Essai clinique EPAG-2015. L'essai clinique du FILO dont d'inclusion des patients est terminée depuis l'an dernier comprends 115 patients traités par chimiothérapie intensive consolidée par ELT ou un placebo. Au diagnostic des cellules, sérums, ARN et ADN sont conservés à la Filothèque et le suivi clinique des patients se fera sur 6 ans.



École Pratique
des Hautes Études



ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES Sciences et Vie de la Terre

Le fer mitochondrial acteur de la résistance dans les leucémies aiguës myéloïdes

Estelle SALAND

Le 18 novembre 2022

Mots clés :

Fer, métabolisme mitochondrial, résistance thérapeutique, leucémies aiguës myéloïdes

Résumé :

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont des hémopathies malignes très hétérogènes. Le traitement de première ligne associe la cytarabine (AraC) et une anthracycline. Même si ce traitement de référence est efficace, le taux de rechute reste élevé et est supérieur à 50% dans les 5 ans suivant la chimiothérapie intensive. Il est alors indispensable de mieux connaître les mécanismes impliqués dans la persistance des cellules de LAM à ces traitements. Le métabolisme mitochondrial joue un rôle déterminant dans ces mécanismes de résistance. En particulier, les cellules résistantes à l'AraC présentent une phosphorylation oxydative exacerbée. Cependant, les cofacteurs indispensables au maintien d'une activité mitochondriale élevée ne sont pas connus. Dans ce contexte, nous étudions l'implication de l'homéostasie du fer dans la résistance thérapeutique et la contribution du microenvironnement médullaire dans l'apport en fer aux cellules leucémiques persistantes et résistantes. Dans ce projet, nous avons montré qu'Eltrombopag (ELT), un agoniste de récepteur à la thrombopoïétine, chélate le fer mitochondrial ce qui conduit à l'ouverture du pore de perméabilité mitochondriale et donc à la mort par apoptose des cellules leucémiques. Son association avec AraC *in vitro* et *in vivo* restaure la sensibilité des cellules à cet agent chimiothérapeutique. Nous avons alors démontré que le fer mitochondrial est augmenté dans les cellules résistantes à l'AraC et que son accumulation entraîne une augmentation de sa contribution aux machineries de synthèse des motifs fer-soufre et des hèmes. La chélation du fer mitochondrial par ELT a permis d'établir que cette homéostasie du fer mitochondrial accrue participe à l'augmentation de la biogénèse mitochondriale, des activités de la chaîne respiratoire et du cycle de Krebs (aconitase) et au maintien de la capacité à augmenter la consommation d'oxygène en réponse à l'AraC. Cependant, nous avons observé que seulement 60% des échantillons de patient traités *ex vivo* répondent à cette association thérapeutique. Les analyses des caractéristiques mutationnelles des échantillons testés a permis de définir certaines mutations (p53 et FLT3-TKD) pour lesquelles cibler l'homéostasie du fer mitochondrial pourrait donner un réel espoir thérapeutique. Nous avons alors observé que le contenu en fer des blastes leucémiques est régulé par le microenvironnement médullaire. En particulier, le traitement à l'AraC *in vivo* modifie la polarisation des macrophages de la moelle osseuse vers un phénotype M2. Des cocultures entre blastes leucémiques et macrophages montrent que les macrophages de phénotype M2 protègent de la mort induite par l'AraC alors que les macrophages de phénotype M1 induisent de la mort des cellules leucémiques. Ce projet a mis en évidence l'importance de l'homéostasie du fer dans le maintien de l'activité mitochondriale élevée impliquée dans la résistance thérapeutique des cellules de LAM à l'AraC. Nous avons de plus montré le rôle du microenvironnement médullaire dans l'approvisionnement en fer des cellules leucémiques. L'ensemble de ce travail ouvre la porte à une meilleure compréhension des mécanismes de résistance, ce qui devrait conduire au développement de nouvelles opportunités thérapeutiques dans le traitement des LAM.