HAL
open science

Rôle du fer et des espèces réactives de l'oxygène dans la prolifération et la différenciation des leucémies aigües myéloblastiques : caractérisation du système régulateur IRE-IRP dans l'homéostasie du fer de deux lignées leucémiques humaines

Emmanuel Pourcelot

To cite this version:

Emmanuel Pourcelot. Rôle du fer et des espèces réactives de l'oxygène dans la prolifération et la différenciation des leucémies aigües myéloblastiques : caractérisation du système régulateur IRE-IRP dans l'homéostasie du fer de deux lignées leucémiques humaines. Sciences pharmaceutiques. 2013. dumas-01061311

HAL Id: dumas-01061311

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01061311v1

Submitted on 5 Sep 2014

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.

Université Joseph Fourier GRENOBLE PHARMACIE

SICD1 Bibliothèques de l'UJF et de Grenoble INP

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année 2013 N°

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE

Conformément aux dispositions du décret N°90-810 du 10 septembre 1990 tient lieu de

THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

ROLE DU FER ET DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE DANS LA PROLIFERATION ET LA DIFFERENCIATION DES LEUCEMIES AIGUËS MYELOBLASTIQUES

CARACTERISATION DU SYSTEME REGULATEUR IRE-IRP DANS L'HOMEOSTASIE DU FER DE DEUX MODELES LEUCEMIQUES

Emmanuel POURCELOT

Né le 09/07/1985 à Besançon

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Le 04 octobre 2013

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

Président du jury : Pr Pascal MOSSUZ, PU-PH, directeur de thèse
Membres : Pr Christophe RIBUOT, PU
Pr Francine GARNACHE OTTOU, PU-PH
Dr Josiane ARNAUD, PH
Dr Jean-Marc MOULIS, Chercheur - Ingénieur CEA

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
SCIENCES.TECHNOLOGIE.SANTÉ

Doyen de la Faculté : **M. Christophe RIBUOT**

Vice-doyen et Directeur des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT**

Année 2012-2013

ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES (n=11)

BAKRI	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC-IMAG)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wim	Biophysique (U.V.H.C.I)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
DROUET	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I) -
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
LENORMAND	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
RIBUOT	Christophe	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
WOUESSIDJEWE	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER (n=6)

CALOP	Jean	Pharmacie Clinique (TIMC-IMAG, PU-PH)
CORNET	Murielle	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2/PU-PH)
MOSSUZ	Pascal	Hématologie (PU-PH-THEREX-TIMC)
SEVE	Michel	Biochimie – Biotechnologie (IAB, PU-PH)

PROFESSEUR EMERITE (n=1)

GRILLOT	Renée	Parasitologie – Mycologie Médicale (L.A.P.M)

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES (n=31)

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BELAIDI-CORSAT	Elise	Pharmacologie Physiologie –(HP2)
BOURGOIN	Sandrine	Biochimie – Biotechnologie (IAB)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B – LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (I.B.S)

Dernière mise à jour : 24/10/2012 Rédacteur : LANTOU FAURE ; Secrétaire doyen Pharmacie

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique
		(Equipe SIS « Santé, Individu, Société »-EAM 4128)
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M)
GUIEU	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
KHALEF	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC-IMAG)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
MELO DE LIMA	Christelle	Biostatistiques (L.E.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
PERES	Basile	Pharmacognosie (D.P.M)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M.)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie (D.P.M)

MAITRE DE CONFERENCE DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER (n=3)

ALLENET	Benoit	Pharmacie Clinique (THEMAS TIMC-IMAG/MCU-PH)
BUSSER	Benoit	Pharmacie (MCU-PH-IAB-INSERM)
GERMI	Raphaëlle	Microbiologie (U.V.H.C.I/MCU-PH)

PROFESSEUR CERTIFIE (PRCE) (n=2)

FITE	Andrée	P.R.C.E
GOUBIER	Laurence	P.R.C.E

Dernière mise à jour : 24/10/2012 Rédacteur : LANTOU FAURE ; Secrétaire doyen Pharmacie

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
SCIENCES.TECHNOLOGIE.SANTÉ

PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (n=4)

BELLET	Béatrice	Pharmacie Clinique
RIEU	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché – CHU)
TROUILLER	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier – CHU)
DON	Martin	Laboratoire TIMC-IMAG

PROFESSEUR AGREGE (PRAG) (n=1)

GAUCHARD	Pierre-Alexis	(D.P.M)

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES (AHU) (n=2)

SUEUR	Charlotte	Virologie (U.V.H.C.I)
VAN NOOLEN	Laetitia	Biochimie Toxicologie (HP2-DBTP-BGM)

ATER (n= 6)

DAYDE David	ATER	Parasitologie Mycologie (J.R)
FAVIER Mathieu	ATER	Pharmacologie - Laboratoire HP2 (JR)
HADDAD-AMAMOU Anis	ATER	Laboratoire de Pharmacie Galénique
HENRI Marion	ATER	Physiologie – Laboratoire HP2 (JR)
LEHMANN Sylvia	ATER	Biochimie Biotechnologie (JR)
REGENT-KLOEKNER Myriam	ATER	Biochimie (LECA-UJF)

MONITEUR ET DOCTORANTS CONTRACTUELS (n=9)

CAVAREC	Fanny	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)
GRAS	Emmanuelle	(01-10-2010 au 30-09-2013)	Laboratoire HP2 (JR)
LESART	Anne-Cécile	(01-10-2009 au 30-09-2013)	Laboratoire (TIMC-IMAG)
MELAINE	Feriel	(01-10-2011 au 30-09.2014)	Laboratoire HP2(JR)
NASRALLAH	Chady	(01-10-2011 au 30-09.2014)	Laboratoire HP2(JR)
THOMAS	Amandine	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)
LECERF-SHMIDT	Florine	(01-10-2012 au 30-09-2015)	Pharmacochimie (DPM)
BERTHOIN	Lionel	(01-10-2012 au 30-09-2015)	Laboratoire (TIMC-IMAG-THEREX)
MORAND	Jessica	(01-10-2012 au 30-09-2015)	Laboratoire HP2 (JR)

CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »
IBS : Institut de Biologie Structurale
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Dernière mise à jour : 24/10/2012 Rédacteur : LANTOU FAURE ; Secrétaire doyen Pharmacie

Dédicace

A la mémoire de ma chère et tendre petite maman, Pierrette

et aux trop nombreux proches perdues

ces dernières années.

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury

- *Au Professeur Pascal Mossuz, Directeur de thèse*

Merci de m'avoir accueilli au laboratoire d'hématologie durant ces trois années et demi. Je vous remercie de m'avoir fait confiance, de m'avoir encouragé et encadré pour ce travail de thèse.

- *Au Docteur Jean-Marc Moulis,*

Merci de m'avoir accueilli au CEA (puis au LBFA), de m'avoir fait partager votre passion pour la science et de m'avoir encadré pour ce travail de thèse et celui qui va suivre avec la thèse universitaire.

- *Au Professeur Francine Garnache-Ottou*

Je vous remercie de m'avoir fait partager votre passion pour l'hématologie, qui me conduit aujourd'hui à vous présenter une partie du fruit de mes travaux dans ce même domaine. Merci de m'avoir accueilli il y a déjà sept ans à l'EFS avec C. Ferrand pour mon master 1. Je vous remercie également pour votre disponibilité et d'avoir sans hésitation accepté de participer à ce jury.

- *Au Professeur Christophe Ribuot*

Je suis sensible à l'honneur que vous me faites de participer à ce jury de thèse. Je vous remercie de votre disponibilité et de votre soutien dans mes démarches de communication, valorisation et de préservation de la filière IPR. Je vous adresse mon respect et ma plus grande reconnaissance.

- *Au Docteur Josiane Arnaud*

Je vous remercie d'avoir participé à ce travail en m'ayant permis d'effectuer les mesures de fer intra-cellulaire au sein de votre laboratoire et d'avoir accepté de juger ce travail.

Et ensuite, aux nombreuses autres personnes avec qui j'ai travaillé au CHU, au CEA, à la faculté et au campus.

- *Au professeur Benoit Polack*

Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de l'équipe TheREx et vous remercie de votre soutien pour me trouver un financement.

- *Aux deux coordinateurs IPR : Florence Morfin et Patrice Faure*

Je vous remercie de votre investissement dans notre filière.

- *Aux équipes du DHOGI, praticiens et techniciens d'hématologie cellulaire et d'hémostase, tout particulièrement à Julie et Raphael.*
- *A mes deux techniciennes de routine préférées : Anne et Lauriane*

Merci de votre soutien, votre bonne humeur et votre investissement, même quand je bouscule vos pratiques. Nous avons accompli un beau travail au centre d'exploration de l'hématopoïèse ces deux dernières années. Il y a encore du pain sur la planche et j'espère pouvoir poursuivre cela avec vous durant encore quelques temps.

- *A notre cadre de choc : Patricia*

Merci pour ta disponibilité, ton aide, ta bonne humeur et surtout ton efficacité.

- *A nos secrétaires : Christine, Amandine G., Audrey, Emilie, Amandine L. et Cyrielle.*
- *A toute l'équipe de CGD*

Je vous remercie de m'avoir enseigné la technique de western blot, de m'avoir aidé et conseillé pour mon master 2, et surtout de me convier à vos petits repas fort sympathiques.

- *A l'équipe de garde : Camille, Dominique, Isabelle, Solène, Fabrice, Franck, Julien, Nicolas...*
- *Aux techniciennes du laboratoire des éléments traces, Dominique et Marie-Christine.*
- *A mes deux techniciennes de recherche préférées : Peggy et Marine*

  Merci de votre soutien, vos conseils et vote aide pour certaines techniques.
- *A toute l'équipe TheREx*
- *Aux collègues du CEA : Mireille, Alexandre et Mohammed.*
- *A mes collègues IPR en voie de disparition : Delphine, Julie, Kathy, Sébastien et Pauline; à la dernière PS Grenobloise: Charlotte; et aux membres de l'asso ASPIRAL.*
- *Aux collègues de master 2 : Guillaume, Lionel et Laetitia.*
- *A mes collègues et compagnons de voyage en Nouvelle Zélande : Anne-sophie, Delphine, Anne-Laure et Benjamin.*

  Ce voyage restera inoubliable. Merci aux filles pour leur organisation de choc.
- *Aux collègues de bio ou PH avec lesquels j'ai partagé un bout d'internat et certains bons moments. Et à mes cliniciens d'hémato préférés : Clara et Sylvain.*
- *A nos modélisateurs: Nicolas Mobilia et Eric Fanchon.*

- *Au personnel du LBFA tout particulièrement Fred, Laurent, Cindy, Gérard, Luc et Joëlle. Et à Cécile pour son aide en cytométrie.*
- *A la plus cool des kinés: Sophie*

Depuis deux ans ta séance de torture est mon moment de décompression et d'évasion de la semaine, merci. Vive la méthode Mézières, ou pas !

- *Aux étudiants du LBFA : Marie, Clovis, Sarah, Charline et Martin*
- *A un collègue, ami et acolyte de rando : Fayçal*

Merci pour ta bonne humeur. Merci de me raisonner sur le choix de nos trajets de rando, enfin d'essayer ! A nos futures sorties.

- *A mes collègues de fac Amélie, Benoît, Romain et Antoine.*
- *Aux équipes officinales de Montferrand et St Ferjeux : Philippe, Marie, JB, Véro, Jocelyne, Sabrina, Pascal, Anne, Catherine et Lise.*
- *A une belle rencontre : Sam*

Tu es un modèle de positivité, tes textes et messages sont tout ce qu'il y a de plus inspirant et encourageant dans les moments difficiles. Tu as trouvé ta voie, continue et ne change pas.

- *A mes amis Thomas, Louise, Mathieu et François*

Vous êtes ma seconde famille. Durant ces neuf années de pharma vous avez dû supporter mes hauts et mes bas, vous n'avez pas toujours compris l'intérêt de travailler et galérer autant pour finir avec si peu (là je vais bientôt finir par vous donnez raison !), mais vous êtes tous présents et cela me touche beaucoup.

- *A mes parents et l'ensemble de ma famille*

Vous m'avez soutenu et encouragé dans ce long parcours d'étude. J'aurai finalement réalisé la moitié de mon rêve de gosse, à savoir être *pharmacien.... en Australie*. Difficile à imaginer quant on sait que petit c'était tout un cinéma pour me faire avaler mes médicaments. Quand à la seconde moitié de ce rêve, elle n'est peut être pas loin, mes voyages m'en rapprochent.

Table des matières

TABLE DES ILLUSTRATIONS *10*

LISTE DES ABREVIATIONS *12*

REVUE GENERALE DE LA LITTERATURE *15*

1. LEUCEMIES AIGÜES MYELOBLASTIQUES (LAM) **15**

1.1 Informations générales *15*

1.2 Incidence et survie *15*

1.3 Physiopathologie *15*

1.3.1 L'origine des clones leucémiques: le concept de cellules souches leucémiques 15

1.3.2 Dérégulation de la survie et de la prolifération 17

1.3.3 Perturbation du processus de différenciation 20

1.3.4 Processus d'échappement à la mort cellulaire 20

1.3.5 Autres anomalies génétiques identifiées et participant probablement à la pathogénèse 20

1.3.6 Anomalies épigénétiques 22

1.3.7 Anomalies métaboliques 23

1.4 Aspect clinique *24*

1.5 Diagnostic biologique *25*

1.5.1 Cytologie et cytochimie 25

1.5.2 Immunophénotypage 27

1.5.3 Cytogénétique 28

1.5.4 Biologie moléculaire 29

1.5.5 Analyse génomique 30

1.6 Diagnostic différentiel *31*

1.7 Le traitement *31*

1.8 Pronostic *34*

1.8.1 Les facteurs pronostiques cliniques 35

1.8.2 Les facteurs pronostiques biologiques 35

2. L'HOMEOSTASIE DU FER **39**

2.1 Le trafic du fer chez l'homme *39*

2.1.1 L'absorption 39

2.1.2 Distribution et recyclage 40

2.1.3 Régulation 41

2.2 Régulation cellulaire du fer: le système IRE-IRP *42*

2.2.1 Structure et fonctionnement 42

2.2.2 Autres stimuli du système IRE-IRP 47

2.2.3 Dysfonctionnement du système régulateur et pathologies associées 47

3. RESEAU REGULATEUR DU FER ET RESEAU REDOX DANS L'HEMATOPOÏESE NORMALE ET LEUCEMIQUE **49**

3.1 Le fer et son système régulateur IRE-IRP dans l'hématopoïèse normale *49*

3.2 Contrôle redox de l'hématopoïèse normale *50*

3.1 Relation entre l'équilibre redox, l'homéostasie du fer et leucémogenèse *52*

4. INTERACTIONS DYNAMIQUES ENTRE RESEAUX BIOLOGIQUES : INTERET DE LA MODELISATION MATHEMATIQUE **56**

OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE *58*

MATERIELS ET METHODES *59*

1. MODELES CELLULAIRES ET POPULATIONS ETUDIEES **59**

1.1 Lignées cellulaires KG1 et K562 ..... *59*

1.2 Cellules hématopoïétiques CD34+ de volontaires sains *60*

2. TECHNIQUES UTILISEES **60**

2.1 Culture cellulaire *60*

2.2 Viabilité cellulaire et cycle cellulaire *61*

2.3 Quantification des transcrits *61*

2.4 Identification et quantification protéique *62*

2.4.1 Lysat cellulaire 62

2.4.2 Western blot 64

2.5 Mesure de l'activité IRP endogène *64*

2.5.1 Lysat cellulaire 64

2.5.2 RNA Electrophoretic mobility gel shift assay (= gel retard) 64

2.6 Mesure de la régulation IRE par activité luciférase *65*

2.6.1 Transfection 65

2.6.2 Mesure de l'activité indicatrice 66

2.7 Mesure du fer intra-cellulaire *67*

2.8 Mesure de la production intracellulaire des espèces réactives de l'oxygène *67*

2.9 Mesure de la peroxydation lipidique *67*

2.10 Mesure du glutathion total *68*

RESULTATS *69*

1. IMAGE DU RESEAU FER DANS UN ETAT DE PROLIFERATION CELLULAIRE VERSUS UN ETAT DE CARENCE EN FER **70**

1.1 A l'échelle moléculaire *70*

1.1.1 Mesure de transcrits: les cibles du système IRP 70

1.1.2 Les effecteurs du système IRP: régulation opérée sur les IRE par les IRP 76

1.2 A l'échelle protéique *77*

1.2.1 Mesure de l'activité des protéines IRP 77

1.2.2 Identification et quantification de protéines clés du réseau 78

1.3 Etat redox dans les modèles cellulaires *80*

2. DE L'EXPERIMENTAL A LA MODELISATION PUIS DE LA MODELISATION A L'EXPERIMENTATION 82

2.1 La modélisation du réseau fer *82*

2.1.1 Méthodologie 82

2.1.2 Exploration du système lors de la simulation d'une carence en fer 83

2.2 Evaluation du seuil $\Theta_{Fe \rightarrow IRP}$ *85*

DISCUSSION *91*

CONCLUSION *101*

REFERENCES *103*

Table des illustrations

Figure 1: Origine et phénotype de surface des cellules souches leucémiques.....16

Figure 2: Dérégulation de la transduction du signal dans les LAM.....18

Figure 3: Impact des mutation IDH, des ERO et de la carence en fer sur les cellules souches leucémiques.....23

Tableau I: Classification FAB des leucémies aigües myéloblastiques.....26

Tableau II: Classification WHO des leucémies aigües myéloblastiques.....27

Figure 4: Illustration de la diversité moléculaire des patients sans anomalies caryotypiques.....29

Tableau IV: Principales mutations identifiées, anomalies cytogénétiques associées et valeur pronostique.....30

Figure 5: Survie des patients traités par chimiothérapie intensive selon l'âge.....33

Tableau V: Récapitulatif des corrélations établies entre données cytogénétiques et données moléculaires. 37

Figure 6: Les flux du fer dans les différents types cellulaires.....41

Figure 7: Le fer et son système de régulation IRP/IRE au niveau des érythroblastes. 43

Figure 8: Fonctionnement du système Iron Responsive Element - Iron Regulatory Protein.45

Figure 9: Conséquence de l'activation/inactivation des IRP sur la traduction des transcrits cibles.....46

Figure 11: Observation au microscope optique des lignées cellulaires.....59

Tableau VI: Séquences des amorces de qPCR.....63

Figure 12: Structure des deux plasmides présentant une activité reportrice luciférase.....66

Figure 13: Schéma simplifié du réseau fer au niveau cellulaire.....69

Figure 14: Quantification relative des transcrits sélectionnés pour des cellules proliférantes.....71

Figure 15: Cycle cellulaire des modèles cellulaires avant et après ajout de deferoxamine 200µM durant 24h.....72

Figure 16: Quantification relative des transcrits sélectionnés pour les modèles cellulaires après carence de 24h en présence de 200µM de deferoxamine. 73

Figure 17: Bilan comparatif des quantifications relatives des transcrits entre cellules proliférantes et cellules dont la croissance est bloquée.....74

Figure 18: Quantification relative des transcrits du réseau fer de cellules CD34+ de sang périphérique provenant d'un donneur sain. *75*

Figure 19: Détermination de l'activité IRP globale avant et après carence ferrique par gel retard. *77*

Figure 20: Identification des protéines d'intérêt du réseau fer par western blot pour les lignées KG1 et K562 en croissance et après traitement par DFO 200µM. *79*

Figure 21: Mesure des espèces réactives de l'oxygène par la carboxy-H2DCF-DA en cytométrie de flux. *80*

Figure 22: Mesure de la peroxydation lipidiques et du glutathion total avant et après carence en fer pour les deux modèles cellulaire. *81*

Figure 23: Exemple de deux équations différentielles représentant l'évolution de la concentration en ferroportine et la concentration d'IRP dans le temps. *82*

Figure 24: Simulation dynamique du comportement de chacune des espèces à travers le temps lorsque l'entrée de fer est coupée à T+6h. *84*

Figure 26: Evolution du pourcentage de cellules en phase G2, de la concentration intra-cellulaire en fer et de la densité après 24h de carence par deferoxamine 200µM, puis 24h de supplémentation en transferrine chargée selon différentes concentrations. *86*

Figure 27: Identification protéique par western blot et évolution des concentrations de Ft et TfR1. ..... *87*

Figure 28: : Identification protéique d'IRP 1 par western blot, évolution des sa concentration et détermination du pourcentage d'IRP (IRP 1 + IRP 2) actif. *88*

Figure 29: Exemple d'évolution du cycle cellulaire pour K562 selon les différentes conditions de supplémentation en fer. *89*

Liste des abréviations

- *2HG: 2-hydroxyglutarate*
- *αGlo: α-globine*
- *ACO2: Aconitase 2*
- *ADN: acide désoxyribonucléique*
- *ADNc: acide désoxyribonucléique complémentaire*
- *ARN: acide ribonucléique*
- *ALAS2: 5-aminolevulinic acid synthase 2*
- *ATRA: acide tout-trans-rétinoïque*
- *BAALC: Brain and acute leukemia cytoplasmic gene*
- *βGlo: β-globine*
- *BSA: bovine serum albumine*
- *carboxy-H2DCF-DA: carboxy-dihydrodichlorofluoresceine diacétate acetyle ester*
- *Cdk: cyclin dependent kinase*
- *CEBPA: CCAAT enhancer binding protein alpha*
- *CSH: cellules souches hématopoïétiques*
- *CSL: cellules souches leucémiques*
- *Dcytb: Duodenal cytochrome b reductase*
- *DFO: deferoxamine*
- *DMT1: Divalent Metal Transporter 1*
- *DNMT: DNA méthyltransférase*
- *DTNB: acide 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoique*
- *EDTA: acide éthylène diamine tétraacétique*
- *EPO: érythropoïétine*
- *EpoR: Récepteur de l'Epo*
- *ERG: ETS-Related Gene*
- *ERO: espèces réactives de l'oxygène*
- *FAB: French-American-British group*
- *FISH: fluorescence in situ hybridization*
- *FLT3: FMS like tyrosine kinase 3*
- *FoxO: Forkhead box O*
- *FPN1a: ferroportine (=SLC401A)*

- *Ft: Ferritine*
- *FTH: Ferritine heavy/heart*
- *FTL: Ferritine light/liver*
- *γGlo: γ-globine*
- *GSH: glutathion*
- *H_2O_2: peroxyde d'hydrogène*
- *Hb: hémoglobine*
- *HCl: acide chlorydrique*
- *HCP1: Hème Carrier Protein 1*
- *HDAC: histone désacétylase*
- *HIF: Hypoxia Inducible Factor*
- *HILPDA: Hypoxia inducible lipid droplet-associated*
- *HO-1: Hème oxygénase-1*
- *HO-2: Hème Oxygénase-2*
- *hPRT: hypoxanthine phosphoribosyl transferase*
- *HRE: hypoxia responsive element*
- *HRP: Horseradish Peroxidase*
- *ICP-MS: Inductively coupled plasma mass spectrometry*
- *IDH: isocitrate déshydrogénase*
- *IPR -/-: IRP knock out*
- *IRP 1: Iron Regulatory Protein 1*
- *IRP 2: Iron Regulatory Protein 2*
- *IRE: Iron Responsive Elements*
- *ITD: internal tandem duplication*
- *Jnk: c-Jun N-terminal kinase*
- *KG: α-cétoglutarate*
- *LAM: leucémies aiguës myéloblastiques*
- *LMC: leucémie myéloïde chronique*
- *MAPK: Mitogen activated protein kinases*
- *MDS: syndromes myélodysplasiques*
- *ME: β2-mercaptoéthanol*
- *MGG: May-Grunwald-Giemsa*
- *MLL-PTD: Mixed Lineage Leukemia- Partial Tandem Duplication*
- *MN1: Meningioma 1 gene*

- *MPO: myéloperoxidases*
- *NADPH: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate*
- *ND: non déterminé*
- *NDRG1: N-myc down regulated gene 1*
- *NASDA: α-naphtyl acétate estérases*
- *NF-κB: nuclear factor-κB*
- *NPM1: Nucleophosmin*
- *PCR: Polymerase Chain Reaction*
- *PLC: Programmation Logique avec Contraintes*
- *pRb: retinoblastoma susceptibility gene product*
- *qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction*
- *REMSA: RNA Electrophoretic mobility gel shift assay*
- *RR: ribonucléotide réductase*
- *RTK: récepteurs tyrosine kinase*
- *SCF: Stem cell factor*
- *SSA: acide 5-sulfosalicylique*
- *SVF: serum de veau fétal*
- *TBA: acide thiobarbiturique*
- *TET2: Ten-eleven translocation 2*
- *TfR1: Transferrin Receptor 1*
- *TKD: tyrosine kinase domain*
- *WHO: World Health Organisation*
- *WT1: Wilms tumor suppressor gene 1*

Revue générale de la littérature

1. LEUCEMIES AIGÜES MYELOBLASTIQUES (LAM)

1.1 Informations générales

Les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) sont des hémopathies malignes caractérisées par une prolifération incontrôlée de précurseurs hématopoïétiques immatures. Cette accumulation de clones malins au niveau médullaire puis sanguin est liée à un blocage du processus de différenciation associé à une hématopoïèse non fonctionnelle qui aboutit à une insuffisance médullaire. Le caractère aigu est défini par l'évolution rapide vers le décès en l'absence de pris en charge thérapeutique.

1.2 Incidence et survie

Les LAM représentent 30% des leucémies de l'adulte. Chaque année 18 300 nouveaux cas sont diagnostiqués en Europe. Cela correspond à une incidence de 2 à 4 pour 100 000 habitants par an. Ce type de leucémie touche des personnes de tout âge, avec une médiane autour de 60 ans. La survie à 5 ans d'un adulte atteint d'une LAM est estimée à environ 23% (1). Cette survie n'est pas influencée par le sexe mais décroit avec l'âge du patient. Certains facteurs de risque favorisent l'apparition des LAM. Parmi ceux-ci on retrouve l'exposition aux radiations ionisantes, l'exposition à des substances chimiques telles que le benzène, le traitement par certains anticancéreux (chlorambucil, cyclophosphamide, melphalan…), l'évolution d'autres hémopathies malignes (néoplasmes myéloprolifératifs, néoplasmes myélodysplasiques) et les pathologies génétiques congénitales telles que la Trisomie 21, la maladie de Fanconi ou l'ataxie telangiectasie.

1.3 Physiopathologie

1.3.1 L'origine des clones leucémiques: le concept de cellules souches leucémiques

Les cellules initiatrices, identifiées par Dick et al. (2) et dénommés cellules souches leucémiques (CSL), sont des cellules malignes dérivées des cellules souches

hématopoïétiques (CSH) ou progéniteurs myéloïdes précoces (*Fig. 1A*). Les caractéristiques du phénotype immunologique de surface sont présentées sur la *figure 1B,* avec en gras les marqueurs présents sur les CSH mais manquants sur les CSL et en rouge ceux présents sur les CSL mais absents ou faiblement exprimés sur les CSH.

Les LAM étant des entités cliniquement et biologiquement hétérogènes, cela suggère l'existence de différents mécanismes moléculaires aboutissant à leur apparition, mécanismes à ce jour toujours mal identifiés et mal compris. Il est admis que l'accumulation d'un certain nombre de mutations est nécessaire à leur apparition, dans un processus dit multi-étapes. Ainsi, de par leur capacité d'auto-renouvellement et donc de persistance dans la moelle, les CSH peuvent subir ce processus multi-étapes qui fait d'elles des candidates idéales à l'origine des CSL. Il a été également constaté que l'activation d'oncogènes chez des progéniteurs précoces pouvait rétablir la capacité d'auto-renouvellement (3).

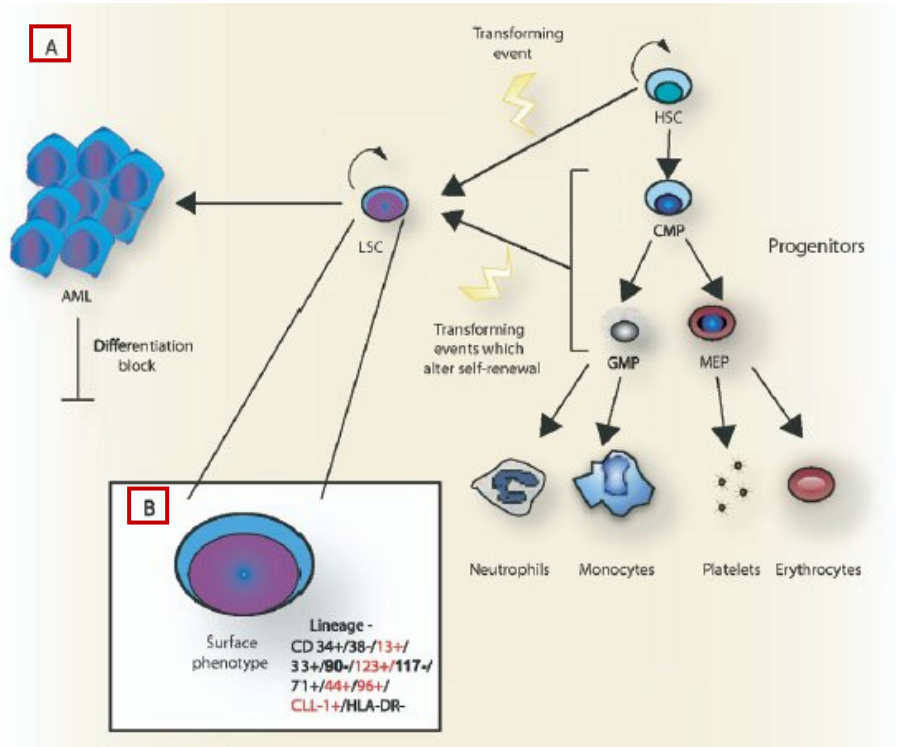


Figure 1: Origine et phénotype de surface des cellules souches leucémiques.

D'après Chan et al., Semin Oncol 2008.

On a donc des possibilités de destin cellulaire identiques pour CSH et CSL, à savoir auto-renouvellement, différentiation, apoptose ou quiescence, mais ces processus contrôlant ces choix sont dérégulés dans les CSL. La leucémogénèse nécessiterait donc d'une part

l'activation de gènes impliqués dans la transduction du signal à l'origine de la survie et de la prolifération cellulaire comme les mutations activatrices de FLT3, KIT ou RAS. Et d'autre part la mutation de gènes affectant les facteurs de transcription à l'origine d'une perturbation du programme de différenciation, comme les réarrangements t(8 ;21), inv(16) et t(15 ;17) générant les transcrits de fusion RUNX1/ETO, CBFB/MYH11 et PML/RARα (4-6).

1.3.2 Dérégulation de la survie et de la prolifération

Les récepteurs tyrosine kinase (RTK), les éléments de la famille RAS, les cascades d'activation PI3K/AKT et RAF/MEK/ERK, sont les principaux intervenants du réseau de signalisation cellulaire ayant été identifiés comme dérégulés en raison de mutations activatrices induisant un gain de fonction, ou d'une perturbation de leurs molécules régulatrices.

Les RTK permettent la transduction du signal du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire après fixation de leurs ligands, principalement des facteurs de croissance, hormones ou cytokines. Parmi ces RTK, les altérations de FLT3 et KIT sont les mieux décrites.

- *FMS like tyrosine kinase 3 (FLT3):*

FLT3 est nécessaire à la prolifération des progéniteurs précoces. Après liaison de son ligand, FLT3 se dimérise ce qui conduit à une autophosphorylation du domaine kinase et ainsi l'activation en cascade de la voie PI3K/AKT et de RAF activant à son tour la voie RAF/MERK/ERK (*Fig. 2*). Deux mutations sur des domaines fonctionnels ont été identifiées pour FLT3, l'une sur un domaine ayant un rôle dans l'auto-inhibition (domaine juxta-membranaire, exon 14 et 15) caractérisée par une duplication en tandem, d'où le nom de FLT3-ITD (*internal tandem duplication*). Cette mutation conduit à une dimérisation et une autophosphorylation indépendante de la présence de ligand. Et la seconde, FLT3-TKD (tyrosine kinase domain), moins fréquente, sur la boucle d'activation du domaine tyrosine kinase, est caractérisée par une mutation ponctuelle (insertion ou délétion) (7). Il a été également montré dans certain cas une surexpression de FLT3 probablement liée à une activité autocrine ou paracrine stimulée par le ligand (8) et également une anomalie de régulation négative liée à l'inactivation de la CBL ubiquitine ligase responsable de l'internalisation et la dégradation de FLT3 (9) (*Fig. 2*).

Bien que les différents types de mutation identifiés soient tous activateurs de FLT3 et confèrent un avantage de croissance aux progéniteurs, tous n'agissent pas de la même façon sur la signalisation. Ceci est illustré par le fait que certaines induisent l'activation de STAT5 (10) à la différence d'autres, pouvant ainsi expliquer les différences cliniques constatées.

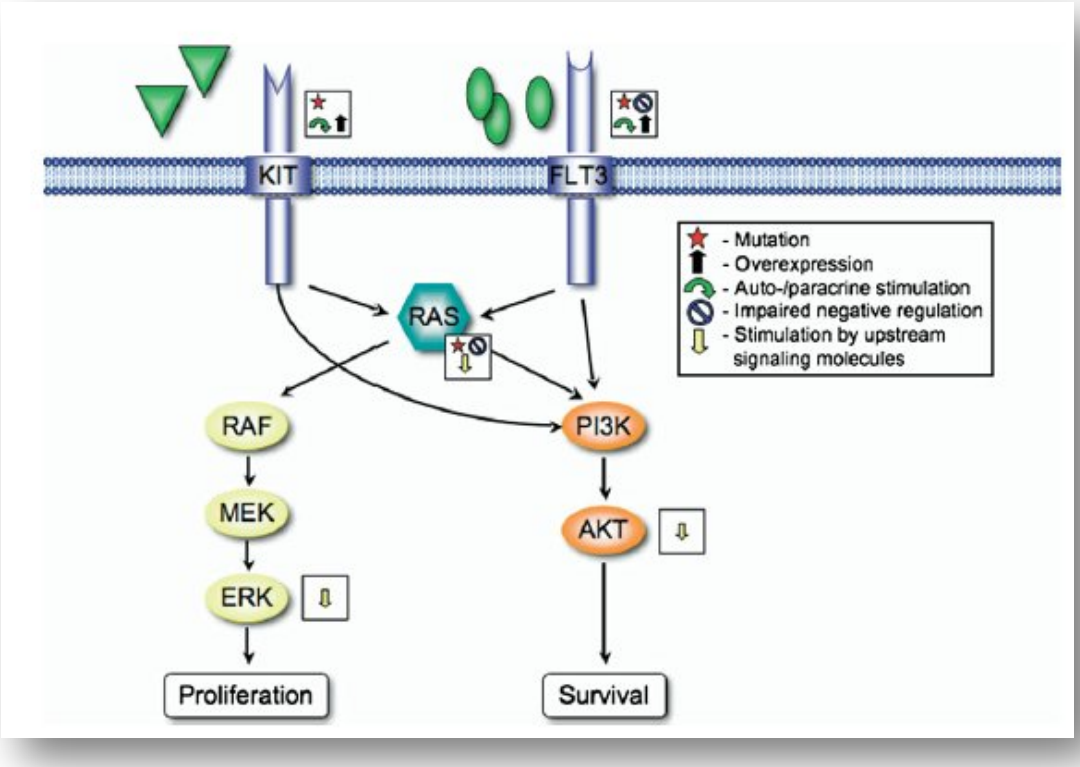


Figure 2: Dérégulation de la transduction du signal dans les LAM.

D'après Scholl et al., Semin Oncol 2008.

- *Récepteur c-Kit :*

Le second grand récepteur tyrosine kinase impliqué est c-Kit. Nécessaire à la prolifération et la survie des cellules souches hématopoïétiques et des progéniteurs engagés, son ligand est le *stem cell factor* (SCF). c-Kit fonctionne comme FLT3 par dimérisation puis autophosphorylation stimulant la transduction du signal (11) (*Fig. 2*). Exprimé dans 80 à 90% des LAM (12), il est caractérisé par une activation constitutive. Cette activation peut être le fruit d'une mutation (délétion ou substitution) soit sur le domaine responsable de la dimérisation qui devient alors spontanée (13, 14), soit sur la boucle d'activation (petite insertion ou substitution) comme par exemple au niveau du codon de D816 induisant

l'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT et STAT3 (15, 16). Comme pour FLT3, il a été décrit une phosphorylation constitutive de c-Kit liée à une stimulation autocrine ou paracrine de SCF. Cependant bien que plusieurs systèmes de régulation de c-Kit existent, aucune dérégulation de ceux-ci n'a été mise en évidence dans le processus de leucémogénèse.

- *RAS:*

Les protéines RAS sont des protéines de signalisation intermédiaire, intervenant dans l'ajustement du signal de transduction en aval des RTK. La conformation active de RAS liant le GTP, joue un rôle central en activant les voies PI3K/AKT et RAF/MEK/ERK (*Fig. 2*). Son activation aberrante conduit ainsi à favoriser survie et prolifération. L'activation excessive est soit liée à l'augmentation de signalisation via les RTK précédemment décrits, soit liée à des mutations non-sens qui suppriment l'activité régulatrice GTPase (17). On retrouve les mutations NRAS et KRAS dans 10 à 14% des LAM (18).

Contrairement aux tumeurs solides, les perturbations directes des éléments des cascades de signalisation RAF et PI3K ou de leurs régulateurs sont rares ou encore non identifiées. On a donc une très grande hétérogénéité des anomalies moléculaires mais un nombre plus restreint de voies de signalisation dérégulées.

- *Auto-renouvellement:*

Le processus d'auto-renouvellement des CSH fait intervenir les éléments suivants: HOX gènes, voie WNT/βcatenin, axe PTEN/AKT/FoxO, protéine BMI1, groupe des protéines polycomb et les voies NF-kB, IRF-1, DAPK, HIF, mTOR, NOTCH, HEDGEHOG... . Certains de ces éléments sont perturbés ou constitutivement activés dans les CSL. Ainsi les gènes HOX, critiques pour l'hématopoïèse, sont dérégulés dans la majorité des cas de LAM (19). Bien que toutes les mutations associées ne soient pas identifiées et la nature de la dérégulation inconnue, on notera l'association de cette dérégulation des gènes HOX au réarrangement du gène *Mixed Lineage Leukemia- Partial Tandem Duplication* (MLL-PTD) dans 5 à 10% des LAM (20). La voie PI3K-AKT-FoxO, ayant un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire par l'intermédiaire de p21, présente également une activation constitutive dans les LAM. Il en est de même de la voie WNT/βcatenin faisant intervenir les catenines α, β et γ (21).

1.3.3 Perturbation du processus de différenciation

Cette perturbation de la différenciation serait due à la répression de gènes nécessaires à ce processus. D'une part avec des mutations inactivatrices comme pour *CCAAT enhancer binding protein alpha* (CEBPA), un facteur de transcription impliqué dans l'engagement cellulaire et la différenciation des progéniteurs myéloïdes vers la lignée granuleuse et plus particulièrement les neutrophiles. La mutation non-sens de CEBPA au niveau N-terminal donne une protéine tronquée non fonctionnelle et la mutation C-terminale conduit à une absence de liaison à ADN ou une dimérisation. D'autre part, le défaut de différenciation peut être la conséquence d'une répression par des protéines oncogéniques avec notamment les protéines de fusion RUNX1-ETO ou PML-RARA, fruits des translocations t(8;21)(q22;q22) et t(15;17)(q22;q12) respectivement (22).

1.3.4 Processus d'échappement à la mort cellulaire

L'une des voies de signalisation différenciellement activée entre CSH et CSL est la voie du *nuclear factor-κB* (NF-κB). Cette voie induit des signaux de croissance, de survie cellulaire et enfin d'invasion cellulaire au détriment du processus apoptotique. Elle a été identifiée comme étant activée dans les cellules CD34+ leucémiques (23). In vitro, grâce à des inhibiteurs directs ou indirects de NF-κB, on a pu déclencher l'apoptose des CSL CD34+ par induction d'une réponse apoptotique via l'activation de p53, tout en préservant les CSH. Cette réponse était accompagnée de conditions pro-oxydantes notamment une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (24).

1.3.5 Autres anomalies génétiques identifiées et participant probablement à la pathogénèse

- *Nucleophosmin (NPM1):*

NPM1 est une phosphoprotéine du noyau impliquée dans la synthèse ribosomale, la réponse au stress, le maintien de la stabilité génomique et la régulation de l'activité et de la stabilité de gènes suppresseurs de tumeurs tel que p53 ou ARF (25). La mutation de l'exon 12 conduit à une anomalie de répartition avec une localisation majoritairement cytoplasmique. De plus,

NPM1 nucléaire est recrutée pour dimérisation au niveau cytoplasmique. Cette mutation est présente dans 24 à 35% des LAM (26).

- *ETS-Related Gene (ERG) et Brain and acute leukemia cytoplasmic gene (BAALC):*

ERG est un facteur de transcription impliqué dans la régulation de la prolifération et de la différenciation. Issu de plusieurs réarrangements chromosomiques dont t(16;21)(p11;q22) avec la protéine de fusion FUS-ERG et t(X;21)(q25-26;q22) avec ELF4-ERG, son implication est suspectée dans la leucémogénèse myéloïde et lymphoïde.

De même BAALC, surexprimé dans les LAM avec trisomie 8, d'expression variable chez les patients de caryotype normal et dont le rôle de la protéine codée est inconnu, est suspecté d'être impliqué dans le même processus que ERG. D'autant plus que pour des cellules hématopoïétiques saines, une surexpression de BAALC est retrouvée aux stades précoces des progéniteurs puis décroit lors de la différenciation (27).

- *Meningioma 1 gene (MN1):*

Impliqué dans la translocation t(12;22)(p13;q11) avec la protéine de fusion MN1-TEL, le gène MN1 est capable (en association avec d'autres oncogènes) d'induire une LAM dans un modèle murin. Ce phénomène est lié à sa capacité à induire l'auto-renouvellement et à bloquer la différenciation.

- *Anomalie chromosomiques:*

Les LAM sont également caractérisées par de multiples anomalies chromosomiques, cependant les conséquences moléculaires et leur impact sur le processus tumoral n'est pas toujours bien identifié. Ainsi, la délétion 17p est associée à la mutation du gène TP53 codant p53 et participant de ce fait à l'instabilité génétique et l'accroissement de la survie cellulaire (28). La délétion 17q est associée à des altérations du gène NF1 et celle de 5q31 est associée au gène CTNNA1 codant l'α-catenine. L'amplification de 11q23-24 est associée aux gènes ETS1, FLI1, DDX6 et MLL et celle de la région 11q13.5 est associée au gène GAB2. Quant à l'amplification de la région 13q12 elle est associée aux gènes FLT3, FLT1, PAN3 et CDX2. CDX2 code notamment les régulateurs de la voie HOX dont la surexpression a été identifiée

chez les patients présentant un caryotype normal ou présentant les translocations t(9;11), t(15;17), t(8;21) ou inv(16).

1.3.6 Anomalies épigénétiques

Comme la plupart des tumeurs solides les LAM présentent des altérations épigénétiques. Très peu d'informations sont connues sur le rôle de ces altérations dans le processus leucémique. Etant donné qu'il est estimé que 8,3% des îlots CpG présentent une dérégulation de méthylation, cela correspond à un potentiel d'au moins 2000 gènes réprimés dont l'impact sur la leucémogénèse reste à déterminer. La première altération identifiée fut celle de la méthylation en 5' du gène de la calcitonine. Une décroissance, du niveau global de 5-methylcytosine lors de la rechute a été mise en évidence, suggérant un rôle dans la résistance thérapeutique (29). Dans un génome leucémique globalement hypométhylé (30), certains gènes se distinguent car hyperméthylés et donc réprimés. Ce sont des gènes suppresseurs de tumeurs ayant un rôle dans le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ou l'apoptose (29). L'exemple le mieux décrit est celui de TET2 (Ten-eleven translocation 2) , une dioxygénase α-kétoglutarate et fer dépendante, qui hydroxyle les 5-méthylcytosine et donc participe à la déméthylation de l'ADN. Les mutations directes de TET2, ou celles d'IDH qui indirectement répriment l'activité de TET2, conduisent à un phénotype d'hyper-méthylation qui perturbe la différenciation myéloïde (31).

Ces altérations peuvent être la conséquence d'un certain nombre des altérations géniques décrites précédemment. C'est ce qui est suggéré avec la découverte d'une capacité des protéines de fusion dont PML-RARA et RUNX1-ETO à recruter les *DNA méthyltransférase* (DNMT) et les *histone désacétylase* (HDAC) (32, 33). De même la protéine MLL présente un domaine liant l'ADN correspondant à une activité méthyltransférase qui est perdue dans certaines protéines de fusion dont fait partie MLL mais pas la plus fréquemment rencontrée MLL-PTD, et dans les deux cas aboutissant pourtant à une perturbation des gènes HOX.

Enfin, certaines anomalies d'expression de microARN ont été associées à des anomalies moléculaires sans que l'on ne connaisse l'impact physiopathologique sur les LAM. Ainsi, les patients présentant la mutation FLT3 ITD montrent une surexpression de miR-155 et ceux présentant la mutation NPM1 ont une surexpression de miR-10a, miR-10b, miR-196a et une sous-expression de miR-204 et miR-128.

1.3.7 Anomalies métaboliques

Des travaux récents ont souligné que certaines de ces mutations moléculaires pouvaient modifier l'équilibre métabolique des cellules leucémiques favorisant la prolifération au détriment de la différenciation. Un exemple très significatif est celui des mutations somatiques affectant l'*isocitrate déshydrogénase* (IDH) 1 ou 2 dans certaines LAM. Ces mutations, initialement observées dans les gliomes, induisent la production de *2-hydroxyglutarate* (2HG) au détriment d'*α-cétoglutarate* (KG). Comme mentionné précédemment ce changement est associé, entre autres, à un phénotype d'hyper-méthylation de l'ADN par diminution de l'activité de l'enzyme TET2, en raison de la capacité du 2HG à interagir avec celle-ci. Ceci a pour conséquence d'impacter la différenciation hématopoïétique normale tout en favorisant le processus leucémique (31). Récemment, Losman *et al.*, ont confirmé *in vitro* que l'énantiomère (R)-2HG induit la transformation leucémique par sa capacité d'onco-métabolite à favoriser la croissance indépendamment des cytokines et le blocage de la différenciation induit par l'Epo. L'inhibition de sa production montre une réversibilité de l'effet induit (34). L'altération de la fonction enzymatique normale des IDH1/2 s'accompagne d'une réduction de synthèse du glutathion, secondaire à l'augmentation de la consommation de NADPH par la réaction néomorphique (production de 2HG), l'ensemble diminuant les capacités anti-oxydantes des cellules (35) (*Fig. 3*).

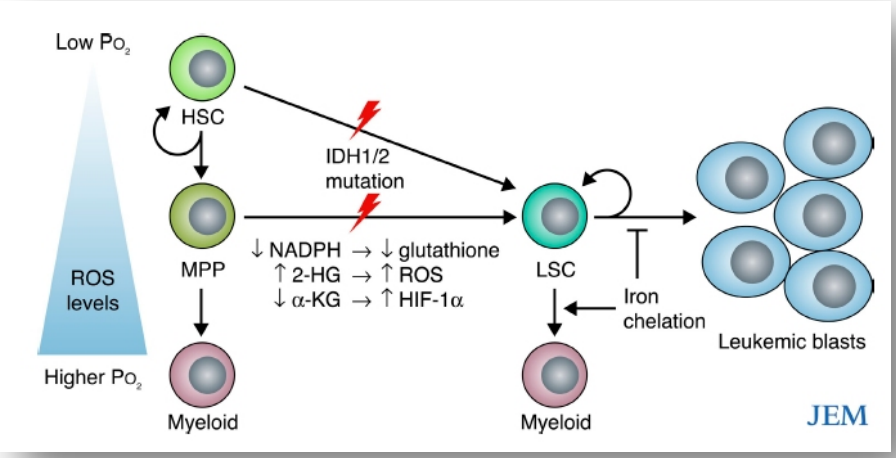


Figure 3: Impact des mutation IDH, des ERO et de la carence en fer sur les cellules souches leucémiques. *D'après Abdel-Wahab et al, J. Exp. Med., 2010.*

La production des ERO semble également impliquée à plusieurs niveaux dans la leucémogénèse. Il a été observé une augmentation des ERO au sein des cellules leucémiques. Le niveau d'ERO est plutôt faible chez les CSH mais nécessaire car ce sont des signaux d'activation de la différenciation à certaines étapes, permettant une sortie de l'état de quiescence avec une réduction de l'auto-renouvellement. Ce processus active la voie AKT et les facteurs de transcription FoxO (35).

Cette élévation des ERO a été mise en lien dans certain cas avec des anomalies moléculaire identifiées. Il a été notamment constaté que les cellules CD34+ exprimant la mutation RAS présentaient un excès de production d'ERO via l'activation de NOX2, une NADPH oxydase (36). Il en est de même avec la mutation FLT3-ITD. Cela suggère que ces perturbations de l'équilibre redox des cellules peuvent participer à la progression leucémique, ainsi que les nombreux dommages cellulaires (exemple: cassures de l'ADN) que les ERO peuvent induire. Ceci favorise un environnement propice à la génération de clones dont certains peuvent acquérir un avantage prolifératif. Les conditions sensiblement pro-oxydantes conduisent généralement à la mort cellulaire, mais les modifications géniques et autres présentes dans les clones leucémiques perturbent cette évolution et permettent la survie et la prolifération. De plus, il a été démontré que l'induction d'une carence en fer favorisait, de manière temps et concentration dépendante, le retour à la différenciation, notamment vers la voie monocytaire *(Fig. 3)*. Or cette chélation du fer génère une augmentation des ERO qui est responsable de cette réactivation de la différenciation entre autre par l'activation de c-Jun N-terminal kinase (Jnk) (37).

1.4 Aspect clinique

Les signes cliniques des LAM sont généralement divers et non spécifiques. Ces signes sont le résultat de l'accumulation des clones cellulaires immatures dans la moelle réduisant le nombre de cellules saines fonctionnelles. Ainsi la cytopénie résultante est à l'origine des signes d'anémie (fatigue, dyspnée, palpitations, pâleur) par la diminution des globules rouges, des signes hémorragiques (épistaxis, saignement gingival, ménorragies, pétéchies, saignements gastro-intestinaux…), par la diminution des plaquettes et des signes infectieux par la neutropénie. L'hyperleucocytose peut induire des signes d'hyperviscosité de type maux de tête, détresse respiratoire, confusion, perturbation visuelles ou cérébrales. Adénopathie et splénomégalie sont rencontrées chez la moitié des patients. Les autres signes cliniques

retrouvés au diagnostic peuvent être liés à une infiltration de différents tissus (système nerveux central, peau, ganglions, foie, tissu gingival…).

1.5 Diagnostic biologique

Le diagnostic biologique repose sur la combinaison de plusieurs disciplines : la cytologie, la cytochimie, la cytogénétique et l'immunophénotypage.

1.5.1 Cytologie et cytochimie

Après identification d'anomalies de représentation des différentes populations cellulaires hématopoïétiques à la numération de la formule sanguine, une analyse plus poussée sur un prélèvement médullaire est réalisée, c'est le myélogramme. La cytologie par l'identification morphologique des cellules leucémiques blastiques au microscope après coloration au May-Grunwald-Giemsa (MGG), reste la méthode de choix lors du primo-diagnostic. Les recommandations suggèrent d'énumérer 500 cellules à partir d'un prélèvement médullaire, permettant ainsi d'établir une classification morphologique reflétant le degré de différenciation et le niveau d'engagement dans les différentes lignées hématopoïétiques. Les blastes, cellules immatures, correspondent à des cellules de taille moyenne à grande avec une chromatine nucléaire finement mottée, et généralement un ou plusieurs nucléoles. Le cytoplasme des myéloblastes contient de fines granulations azurophiles, avec ou sans corps d'Auer.

Cette identification cytologique est couplée à des techniques de réactivité cytochimique, critère d'orientation vers une lignée. Parmi ces réactions, on retrouve la réaction des *myéloperoxidases* (MPO), la réaction au Noir Soudan, ou la réaction des *α-naphtyl acétate estérases* (NASDA) et des estérases non spécifiques (butyrate estérase). On caractérise ainsi par une différentiation myéloïde une réaction MPO positive présente chez au moins 3% des blastes. L'absence de MPO n'exclue pas une morphologie myéloïde en raison d'un manque de MPO chez les myéloblastes et monoblastes précoces. La réaction au Noir Soudan présente la même caractérisation mais de façon moins spécifique. Les monoblastes et monocytes sont caractérisés par la réaction des estérases non spécifiques, et les granuleux et monocytes par la réaction NASDA. La cytochimie est cependant de moins en moins utilisée, au détriment de l'immunophénotypage.

En raison de la variabilité du degré d'engagement et de différenciation des cellules leucémiques dans les différentes lignées, une première classification, définie par neuf sous-groupes morphologiques et leurs résultats cytochimiques correspondant, a été élaborée en 1976 (38), puis révisée en 1985 (39). Cette classification de l'hétérogénéité des LAM porte le nom des trois nations ayant participées à son élaboration : classification FAB pour *French-American-British group* (*Tableau I*). Ce système définissait l'hémopathie rencontrée comme étant une LAM dès la présence de plus de 30% de blastes dans la moelle.

Tableau I: Classification FAB des leucémies aigües myéloblastiques.

Classification FAB		
Catégorie	Dénomination	Incidence
M0	LAM avec différenciation minimale	3%
M1	LAM sans maturation	15-20%
M2	LAM avec maturation	25-30%
M3	Leucémie aiguë promyélocytaire	5-10%
M4	Leucémie aiguë myelomonocytaire	25-30%
M4Eo	Leucémie aiguë myélomonocytaire avec éosinophiles pathologiques	5-10%
M5	Leucémie aiguë monocytaire	2-10%
M6	Erythroleucémie	3-5%
M7	Leucémie aiguë mégacayocytaire	3-12%

Avec l'émergence de nouvelles techniques, la cytogénétique, la biologie moléculaire et l'immunophénotypage ont apporté un certain nombre d'informations sur ces LAM. Et ainsi certaines anomalies génétiques se sont révélées spécifiques de certains types de LAM, permettant également de distinguer de nouveaux sous-groupes de patients avec une réponse au traitement et un pronostic distinct.

Ainsi au début des années 2000, une nouvelle classification fut établie par l'organisation mondiale de la santé : classification WHO (*World Health Organisation*). Cette classification modifie la classification FAB en incluant les anomalies cytogénétiques identifiées et permet

ainsi de mettre à jour des LAM représentant une nouvelle entité clinico-biologique. La classification WHO a diminué le seuil de pourcentage de blastes, définissant une LAM à partir de 20% de blastes présents dans la moelle (40). Elle fut ensuite révisée en 2008 (*Tableau II*). En pratique, les deux classifications sont utilisées de façon complémentaire.

Tableau II: Classification WHO des leucémies aigües myéloblastiques.

Classification WHO			
Catégorie	Dénomination	Caractéristiques	Incidence
1er groupe	LAM avec translocations chromosomiques récurrentes	LAM avec t(8;21)(q22;q22) LAM avec t(15;17)(q22;q12) LAM avec inv(16)(p13;q22) LAM avec anomalies 11q23	5-12% 10-15% 5% 3-5%
2e groupe	LAM avec myélodysplasie multilignée	Avec antécédent de SMD Sans antécédent de SMD	10-15%
3e groupe	LAM secondaires à des thérapies		
4e groupe	LAM non classifiées	LAM M0 à M7 (classification FAB) LAM avec differenciation basophile LAM avec myélofibrose	40-50%

1.5.2 Immunophénotypage

L'immunophénotypage est une technique complémentaire à la cytologie permettant d'affirmer le caractère immature des cellules et de déterminer la lignée impliquée dans une LAM nouvellement diagnostiquée, notamment pour les LAM M6/M7 . En utilisant la cytométrie en flux, plusieurs marqueurs cellulaires (de surface ou cytoplasmique) seront recherchés (*Tableau III*).

Cette technique présente un intérêt particulier lorsque les blastes ne sont pas de nature myéloïde, lorsque la cytochimie est non informative, ou éventuellement pour confirmer l'origine myéloïde des blastes, voir dans certain cas pour identifier la présence de cible thérapeutique. Cette technique a permis la reconnaissance de la catégorie LAM-M0 (LAM peu différenciée) et des leucémies de phénotype mixtes (myéloïde et lymphoïde).

Tableau III: Expression des marqueurs de surface et cytoplasmique utiles au diagnostic de LAM.

D'après Döhner et al., Blood 2010.

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

1.5.3 Cytogénétique

L'analyse cytogénétique fait partie intégrante du diagnostic de LAM avec des anomalies chromosomiques présentes dans 55% des cas des LAM de l'adulte (41) et une classification comprenant désormais une catégorie spécifique avec les anomalies génétiques récurrentes. Mais l'analyse cytogénétique a pris surtout de l'ampleur lorsque la valeur pronostique des anomalies a été déterminée et a permis d'évaluer des différences significatives de survie entre patients. Ceci a conduit à l'édification d'une classification du risque du patient selon le profil caryotypique.

Parmi ces multiples anomalies, nous citerons les plus fréquentes telles que les translocations t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q12), t(9;11)(p22;q23) ou t(16;16)(p13,1;q22); les monosomies 7-, 18- ou 17-; les trisomies 8+, 13+, 21+,22+ et les délétions 5q-, 17p- ou 17q-. Si la majorité des patients présentant des anomalies cytogénétiques ne possèdent que une à deux altérations chromosomiques, 10 à 12 % des patients LAM présentent un caryotype dit complexe avec au moins trois anomalies chromosomiques (définition excluant les translocations t(8;21), t(15;17) et l'inversion du 16). Parmi ces caryotypes complexes, 90% présentent au moins cinq anomalies, avec 55 à 75% présentant une hypoploidie, 25% une hyperploidie, et les quelques pourcent restant présentent une pseudoploidie avec des anomalies structurales, généralement une perte de matériel (exemple: 5q-) qui n'est pas toujours équilibrée (42). L'incidence de ces aberrations augmente avec l'âge du patient et le caractère secondaire de la LAM.

1.5.4 Biologie moléculaire

La plupart des anomalies chromosomiques sont à l'origine d'altérations géniques (réarrangement de gènes, mutations) (*Tableau IV*) détectables par technique fluorescence in situ hybridization (FISH) ou par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Ainsi, on mentionnera, entre autres, les gènes de fusion RUNX1-ETO (dénommé également AML1-ETO) lié à t(8 ;21), CBFβ-MYH11 lié à inv(16) ou PML-RARα lié à t(15 ;17), et les nombreuses mutations acquises intervenant ou non dans la physiopathologie comme pour les gènes FLT3, NPM1, CEBPA, MLL, NRAS, WT1, KIT, TET2, IDH, ASXL1, PHF6, DNMT3A... .

Certaines mutations coexistent comme celles de FLT3 avec celles de NPM1, et d'autres s'excluent comme les mutations IDH avec celles de TET2. Cette extraordinaire hétérogénéité est illustrée par la *figure 4* donnant la répartition des profils mutationnels pour des patients sans anomalie cytogénétique et ne prenant en compte que les six plus fréquentes mutations.

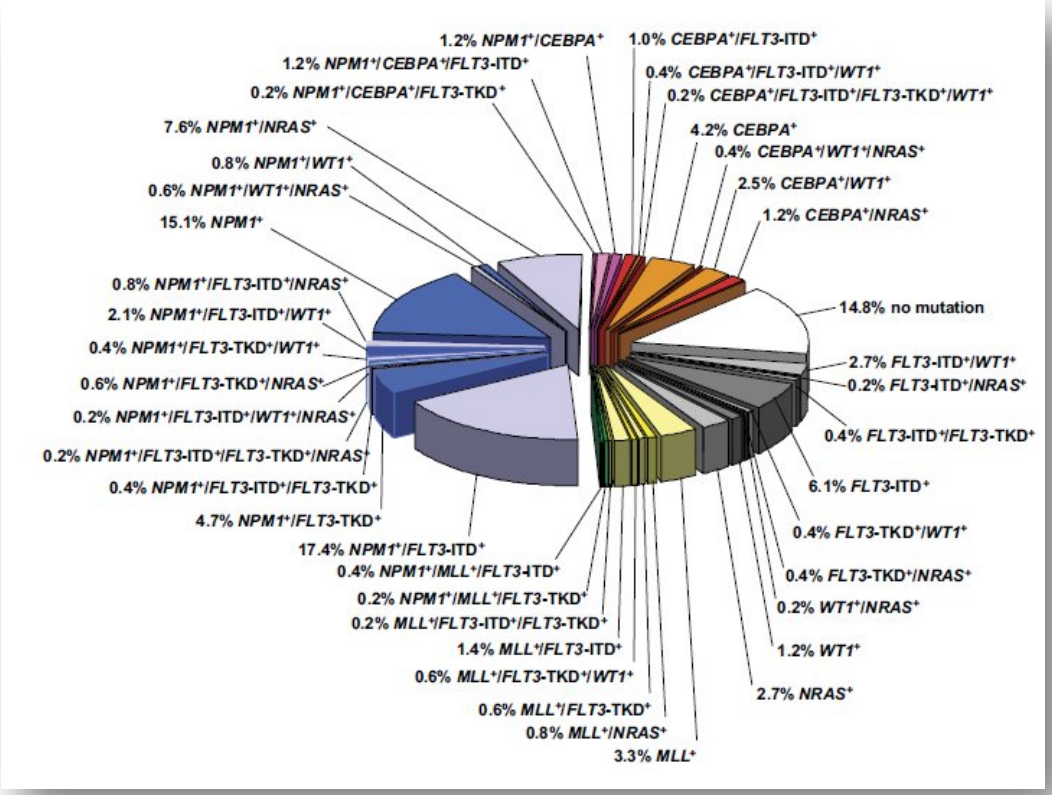


Figure 4: Illustration de la diversité moléculaire des patients sans anomalies caryotypiques.

D'après Döhner et al, Blood 2010.

Tableau IV: Principales mutations identifiées, anomalies cytogénétiques associées et valeur pronostique. *D'après Ferrara et al., The Lancet, 2013.*

	Approximate frequency in de-novo AML	Frequency in CN AML	Strong associations	Not recorded with	Outlook
NPM1	35%	50%	CN AML, *FLT3*-ITD, *FLT3*-TKD, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*	*CEBPA* double mutant	Favourable in patients with CN AML and in elderly patients[22-24]
CEBPA	7%	8–19%	CN AML, *FLT3*-ITD	*NPM1*	Favourable in patients with CN AML (if biallelic)[25,26]
FLT3-ITD	20–25%	30–35%	CN AML, APL, t(6;9), *NPM1*	--	Adverse in patients with CN AML; could vary with allelic burden; no clear effect in patients with APL[27,28]
FLT3-TKD	5%	14%	CN AML, *NPM1*	--	Controversial[29]
KIT	--	25%	Core binding factor leukaemias	Most other karyotypes	Adverse in adult patients with core binding factor leukaemias[30,31]
TET2	8–12%	23%	Possibly CN AML	*IDH1*, *IDH2*	Controversial[32,33]
DNMT3A	14–22%	20–33%	CN AML, *NPM1*, *FLT3*	Core binding factor leukaemias, *CEBPA*, *MLL* translocations	Possibly adverse in patients with CN AML[34-36]
IDH1, *IDH2*	8–16%	30%	CN AML, *NPM1*, *FLT3*	*TET2*, *WT1*	Controversial[37,38]
ASXL1	5–30%	About 10%	Uncommon with *NPM1* and *FLT3*	Possibly *CEBPA*	Adverse in patients with CN AML and older patients; more common in older patients[39]

1.5.5 Analyse génomique

En raison de l'important panel de mutations existant, l'une des nouvelles approches dans les LAM est de réaliser des analyses larges du génome leucémique, déterminant des profils d'expression génique, des profils mutationnels et des profils d'expression de microARN. A partir de ces résultats, de nouvelles informations devraient être apportées permettant une meilleure compréhension de la leucémogénèse, l'identification de nouveaux marqueurs pour le diagnostic ou comme facteur pronostique et enfin l'identification de potentielles cibles thérapeutiques.

L'étude de Panel *et al*., a pu, à l'aide des profils mutationnels, établir des sous-classifications des patients au sein de la classification pronostique par risque (43). Ceci est d'intérêt

notamment pour le risque intermédiaire, catégorie la plus hétérogène. Et, d'autre part, selon ces signatures moléculaires, les auteurs ont pu établir quels patients pouvaient voir leur résultat amélioré en intensifiant la dose thérapeutique. D'autres études ont eu recours à l'analyse d'expression génique par puce à ADN afin de classifier les LAM. De même, les profils des microARN sont étudiés pour établir de nouvelles sous-classifications et ont déjà montré leur capacité à distinguer LAM et leucémie lymphoïde aigue de témoins sains.

Ces analyses à grande échelle ne sont qu'au stade de développement pré-clinique et nécessitent de nombreux essais afin de les valider, mais elles représentent l'une des possibilités d'avenir pour la classification des patients et le développement d'une prise en charge personnalisée.

1.6 Diagnostic différentiel

Les LAM sont à distinguer des syndromes myélodysplasiques, des syndromes myéloprolifératifs, des leucémies aigues lymphoblastiques, des leucémies aigues bi-phénotypiques ou des phases de post aplasie médullaire ou post agranulocytose. La cytologie et la cytochimie sont généralement suffisantes pour éliminer ces diagnostics. L'immunophénotypage s'avère être également un outil très utile dans le diagnostic différentiel.

1.7 Le traitement

Bien que les connaissances sur les LAM aient considérablement évolué ces vingt dernières années, notamment au niveau biologique, la stratégie thérapeutique et les traitements utilisés ont quant à eux peu changé. La base du traitement est constituée d'une polychimiothérapie lourde dont le protocole varie selon l'identification de la LAM et les facteurs pronostiques du patient.

Dans un premier temps le but du traitement est d'induire une rémission complète du patient, rémission définie par la présence de moins de 5% de blastes dans la moelle, l'absence d'invasion extra-médullaire et un retour à une formule sanguine proche de la normale avec un taux de polynucléaires neutrophiles supérieur à 1 G/l, un taux plaquettaire supérieur à 100 G/l

et un taux d'hémoglobine supérieur à 10g/dl (44). Dans un second temps le traitement a pour but d'éviter une rechute.

Le premier traitement est dit *traitement d'induction*, et il a pour objectif la rémission complète du patient. Il comprend une ou deux cures de chimiothérapie à base d'une anthracycline, et de la cytosine arabinoside (cytarabine). Parmi les anthracyclines, ce sont la daunorubicine et l'idarubicine qui sont les plus utilisées. De nombreux protocoles existent, on retiendra le protocole le plus répandu, avec l'administration de daunorubicine à 45mg/m²/j de J1 à J3 et de cytosine arabinoside à 100mg/m²/j de J1 à J10 par voie intraveineuse (ou cytosine arabinoside à 100-200mg/m²/j de J1 à J7 en perfusion continue) (45, 46). Cette phase du traitement induit une phase d'aplasie de 3 à 4 semaines avant une phase de régénération et la rémission. Parmi les patients de moins de 60 ans, 70 à 80% d'entre eux bénéficient d'une rémission complète. Seulement 50% des patients dit âgés (de plus de 60 ans) atteindront cette rémission. Les effets secondaires induits par ce type de traitement sont liés à l'aplasie médullaire. Les risques infectieux et hémorragique sont graves et sont responsables de la mort de 10% des patients durant le traitement d'induction. Les effets les plus fréquemment rencontrés sont les troubles gastro-intestinaux (nausées, vomissements, diarrhées), l'asthénie, l'alopécie et la perte de la fertilité.

Le second traitement, nommé *traitement de consolidation*, ne peut être alors envisagé qu'après rémission. Trois possibilités s'offrent au patient pour ce traitement, du moins pour le patient jeune. Cela comprend des cures de polychimiothérapie pouvant être similaires à l'induction, une greffe de cellules souches hématopoïétiques allogénique, ou une même greffe mais de nature autologue. La greffe allogénique est à ce jour le traitement le plus efficace, il induit le moins de rechute en raison de l'effet du greffon contre la leucémie, mais il existe néanmoins un taux de mortalité de 10 à 25% lié à ce traitement par la réponse de l'hôte au greffon. Les greffes sont réservées aux patients jeunes, sans co-morbidité, mais la diminution de la toxicité du conditionnement a permis d'élargir l'accès à des patients plus âgés. Afin de maintenir la rémission, un *traitement de maintenance* est établi durant 2 à 3 ans, moins intensif constitué de courtes cures de cytarabine associées à une chimiothérapie orale.

Malheureusement les rechutes constituent la première cause d'échec du traitement avec 50 à 80% des patients ayant eu une rémission complète. Ces rechutes sont retrouvées principalement dans la première année qui suit la rémission avec une nouvelle atteinte de la moelle osseuse. La prise en charge de ces patients et leurs chances d'atteindre une seconde

rémission dépendent de la durée de leur première rémission, de leur âge et des caractéristiques cytogénétiques.

- *Cas particulier de la LAM3 :*

La leucémie promyélocytaire (LAM3) est une entité à part notamment du point de vue thérapeutique. Caractérisée par la translocation t(15 ;17) aboutissant à la formation de la protéine de fusion PML/RARα, cette LAM est sensible au traitement par chimiothérapie classique (anthracycline) associée à l'acide tout-trans-rétinoïque (45 mg/m^2/j). Ce traitement d'induction donne d'excellents résultats avec un taux de rémission supérieur à 90% et un taux de guérison proche de 80% (47). L'arsenic trioxide qui a déjà fait ses preuves dans le traitement des rechutes, est en cours d'étude en monothérapie ou en association avec des chimiothérapies ou l'ATRA.

- *Cas des patients âgés :*

Les patients de plus de 65 ans, plus sensibles à la toxicité des agents de chimiothérapies et présentant plus de co-morbidité associées, répondent moins bien au traitement d'induction avec un taux de rémission de l'ordre de 50%. C'est une population plus encline aux anomalies cytogénétiques et aux LAM secondaires et donc avec des LAM plus agressives. Ils nécessitent une chimiothérapie intensive, laquelle affecte fortement leur taux de survie (*Fig. 5*). Toute la difficulté est d'identifier les patients pouvant tolérer un traitement d'induction classique, de ceux pour lesquels ce traitement devra être allégé sachant qu'il a été démontré que le bénéfice-risque de faible dose de cytarabine n'est pas favorable chez les patients fragiles ou avec un caryotype non favorable (48).

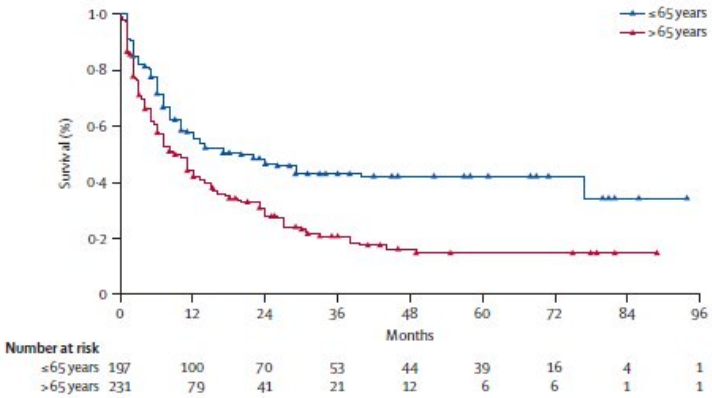


Figure 5: Survie des patients traités par chimiothérapie intensive selon l'âge.

D'après Ferrara et al, The Lancet, 2013

Même si la chimiothérapie conventionnelle a énormément progressé par la réduction des effets indésirables, une meilleure adaptation des posologies..., elle semble tout de même atteindre ses limites. Les découvertes des altérations génétiques et moléculaires dans les LAM ont ouvert la voie à de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. L'avenir du traitement des LAM repose sur notre capacité à traiter les patients spécifiquement en fonction du panel de mutations identifiées, c'est la thérapie dite ciblée. Cependant les LAM résultent de multiples anomalies génétiques ou épigénétiques, ce qui signifie que cibler une seule altération risque d'être insuffisant pour éradiquer le clone leucémique. L'association de plusieurs thérapies ciblées ou avec la chimiothérapie conventionnelle semble indispensable.

Ainsi, à l'heure actuelle, sont en évaluation dans des essais cliniques de phase III, les inhibiteurs de FLT3, les agents déméthylants et un anticorps anti-CD33. Midostaurin, lestaurtinib et sunitinib sont des inhibiteurs de FLT3 en évaluation comme agents de monothérapie dans les rechutes de LAM avec mutation FLT3, et en association avec les traitements d'induction et de consolidation classique dans les LAM de l'adulte jeune avec mutation FLT3. Le taux de réponse chez ces patients semble prometteur. Azacitidine et decitabine sont des agents thérapeutiques déméthylants ayant déjà obtenu l'autorisation de mise sur le marché pour les myélodysplasies et pour les LAM du sujet âgé avec 20 à 30% de blastes en ce qui concerne l'azacitidine. L'évaluation dans d'autres cas de LAM est en cours. Enfin, le *gemtuzumab ozogamicin*, anticorps anti-CD33 lié à un agent cytotoxique (calichéamicine) a déjà été approuvé aux Etats-Unis et au Japon dans les rechutes de LAM chez les patients âgés. Les résultats des essais évaluant son effet en association aux chimiothérapies conventionnelles ont été décevants en ne démontrant pas d'effet bénéfique lors de l'ajout de l'anti-CD33.

1.8 Pronostic

L'hétérogénéité des caractéristiques morphologiques et génétiques des LAM se retrouve dans l'importante variation de réponse des patients aux thérapies. Le taux de rémission complète est estimé entre quarante à quatre-vingt pourcent en fonction de la population étudiée, témoin de l'hétérogénéité clinique. Une chose est sure, en l'absence de traitement, les LAM sont fatales en quelques semaines. Un certain nombre de facteurs pronostiques ont été identifiés pour définir la probabilité d'atteindre une rémission complète, le risque de rechute ou la survie globale.

1.8.1 Les facteurs pronostiques cliniques

- *L'âge :*

Plus l'âge du patient est avancé, plus le pronostic s'avère mauvais en terme de survie mais également en terme de réponse au traitement. Cela en raison de la diminution de la capacité du patient à tolérer la chimiothérapie, mais également par l'accumulation plus importante d'anomalies cytogénétiques.

- *La réponse au traitement :*

Le délai de réponse à la phase d'induction de la chimiothérapie doit être pris en compte pour la suite de la stratégie thérapeutique.

- *Le contexte :*

Les LAM secondaires à une hémopathie ou un traitement par chimiothérapie sont associées à une diminution du taux de survie et de la probabilité de rémission complète.

1.8.2 Les facteurs pronostiques biologiques

- *Cytogénétique :*

Les anomalies cytogénétiques observées constituent les principaux facteurs pronostiques définissant des sous-groupes cliniques différents pour les 50% de patient présentant des anomalies cytogénétiques qualitatives ou quantitatives. Les trois catégories de risque sont définies par un pronostic favorable, intermédiaire ou défavorable.

Ainsi, 25% des patients dont le caryotype est anormal présentent des anomalies favorables en terme de pronostic, cela inclut la translocation t(15 ;17), t(8 ;21) et inv(16). Ces anomalies sont associées à un taux de survie à 5 ans de 65% et un taux de rémission complète de 90% (49). Si d'autres anomalies défavorables sont présentes, le pronostic reste favorable (50).
Les anomalies de la catégorie "risque défavorable" comprennent les délétions du chromosome 7 (7-), du chromosome 5 (5-), du bras long q du chromosome 5 (5q-), les translocations t(9 ;22), t(4 ;11) ou t(1 ;19) en association avec d'autres anomalies, les monosomies et les caryotypes complexes c'est à dire présentant au moins trois anomalies (cinq dans certains essais cliniques) à l'exception des translocations t(8;21), t(15;17) et t(16,16). Cela représent

10% des patients avec un caryotype anormale, généralement des patients plus âgés ou des LAM secondaires. La survie à 5 ans chute alors à 10%.
Le reste des patients (50 à 60%) sont dits de pronostic intermédiaire, la majorité d'entre eux ayant un caryotype normal. Leur pourcentage de survie à 5 ans est alors estimé à 30-40% et le taux de rémission complète à 80%.

Les 40 à 50% de patients de risque intermédiaire sans anomalie chromosomique montre une grande hétérogénéité clinique. Des valeurs pronostiques des anomalies moléculaires (mutations, changement d'expression) ont tout particulièrement été déterminées pour ce groupe permettant dans un avenir proche de définir des sous-groupes au sein des LAM à caryotype normal.

- *Moléculaire :*

Avec l'amélioration des connaissances moléculaires des LAM un très grand nombre d'autres facteurs sont en cours d'évaluation .La présence de la mutation du gène FLT3-ITD s'avère de mauvais pronostic, surtout si la mutation est homozygote (51, 52). La mutation de NPM1 présente dans 43 à 62 % des LAM à caryotype normal est associé à un pronostic favorable pour une rémission complète après chimiothérapie d'induction intensive et une survie sans rechute. Ceci n'est pas le cas si en plus de la mutation NPM1, le patient présente une mutation FLT3 positive (53, 54). Les patients avec une mutation de CEBPA sont de pronostic favorable qu'ils aient un caryotype normal ou non (55). Et la mutation MLL-PTD, présente chez 5 à 11% des patients de caryotype normal, est associée à une durée de rémission complète plus courte et un taux de survie sans rechute faible (55).
A partir de l'analyse des mutations de FLT3, NPM1 et CEBPA, *Döhner et al*. ont proposé une classification standardisée présentant un intérêt clinique et reprenant les corrélations des anomalies cytogénétiques aux données génétiques (*Tableau V*).

Parmi les gènes moins fréquemment altérés des patients LAM, certains ont montré également une valeur pronostique. C'est le cas de WT1, ERG, BAALC, MN1 ou CXCR4.
Le pronostic des patients avec la mutation de *Wilms tumor suppressor gene 1* (WT1) reste incertain bien qu'elle représente 10 à 13% des patients de caryotype normal. Une surexpression du gène ERG est retrouvée chez les patients à caryotype complexe et donc de mauvais pronostic (27). Caractérisé comme facteur pronostique indépendant, la surexpression

de BAALC est associée à un mauvais pronostic avec une diminution de la survie en l'absence des mutations de FLT3, CEBPA ou ERG (27).

Tableau V: Récapitulatif des corrélations établies entre données cytogénétiques et données moléculaires. *D'après Döhner et al, Blood 2010.*

Genetic group	Subsets
Favorable	t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1* inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11* Mutated *NPM1* without *FLT3*-ITD (normal karyotype) Mutated *CEBPA* (normal karyotype)
Intermediate-I*	Mutated *NPM1* and *FLT3*-ITD (normal karyotype) Wild-type *NPM1* and *FLT3*-ITD (normal karyotype) Wild-type *NPM1* without *FLT3*-ITD (normal karyotype)
Intermediate-II	t(9;11)(p22;q23); *MLLT3-MLL* Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse†
Adverse	inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); *RPN1-EVI1* t(6;9)(p23;q34); *DEK-NUP214* t(v;11)(v;q23); *MLL* rearranged −5 or del(5q); −7; abnl(17p); complex karyotype‡

MN1 est associé à une faible réponse du patient au traitement d'induction dans les différentes catégories cytogénétiques, de même que sa surexpression chez les LAM à caryotype normal. MN1 a été caractérisé comme facteur pronostique indépendant défavorable pour la survie globale, la survie sans rechute, le taux de rechute et, lors d'une surexpression il est associé à une résistance du traitement par l'*acide tout-trans-rétinoïque* (ATRA) (27).
Toutes LAM confondues, CXCR4 fortement exprimé, est prédictif de résultats thérapeutiques défavorables avec, de plus, un impact négatif sur la survie chez les patients à caryotype normal sans mutation FLT3 (27).

Enfin, l'expression des microARN permet également de définir un pronostic. C'est le cas pour la surexpression de miR-199a et mi-R191 qui ont un effet négatif sur la survie. Les expressions de miR-9 et miR-let7b ont été corrélées au risque cytogénétique avec l'association d'une faible expression à un risque favorable alors qu'une forte expression est associée à un risque intermédiaire (56).

- *Autres :*

L'augmentation de certains paramètres biologiques est également de mauvais pronostic comme l'élévation des LDH ou l'hyperleucocytose (>20 000/mm^3).
L'élévation de marqueurs du stress oxydant tel que le niveau d'ERO, a également été rattaché à une taux de rechute plus important, ce qui fait des ERO un facteur prédictif potentiel (57).

2. L'HOMEOSTASIE DU FER

Le fer est indispensable à la vie des mammifères dont l'Homme. Ce métal joue de nombreux rôles dans l'organisme humain par sa capacité à échanger des électrons et ainsi participe à un très grand nombre de réactions enzymatiques basées sur un processus d'oxydoréduction. Parmi ces différentes fonctions, on notera par exemple son rôle dans le transport d'oxygène, dans la synthèse d'ADN, dans la chaîne respiratoire ou encore dans le bon fonctionnement des défenses immunitaires. Ainsi au niveau cellulaire un déficit en fer conduit à un arrêt de la croissance et ensuite à la mort (58, 59).

Mais si cet élément est indispensable pour l'organisme, il peut aussi être toxique. En effet, en excès ou mal pris en charge, il peut générer des espèces réactives de l'oxygène (ERO), dont le composé le plus réactif d'entre elles: le radical hydroxyle. Ces espèces réagissent sur tous les composants cellulaires et sont à l'origine de dégâts cellulaires (60). Le déficit en fer comme la surcharge en fer impactent donc le destin cellulaire (survie, prolifération, ou mort) et de l'organisme.

Que ce soit dans un organisme entier ou au niveau cellulaire, le subtil équilibre nécessaire dans la gestion du fer requiert la présence de systèmes régulateurs à différents niveaux (60-62). Ces systèmes qui régissent une série de réactions métaboliques et régulatrices définissent des réseaux, interagissant les uns avec les autres. Parmi ces réseaux, le réseau fer est celui qui joue un rôle fondamental au cœur de la vie cellulaire.

2.1 Le trafic du fer chez l'homme

2.1.1 L'absorption

Le fer est absorbé au niveau du pole apical des entérocytes duodénaux sous deux formes : le fer héminique, via le transporteur *Heme Carrier Protein* 1 (HCP1), et le fer non lié à un cofacteur organique, transporté par le *Divalent Metal Transporter* 1 (DMT1) après réduction de la forme Fe^{3+} en Fe^{2+} par la *Duodenal cytochrome b reductase* (Dcytb) (63) (*Fig. 6)*. Le fer intra-cellulaire est le métal le plus présent et de nombreuses réactions anaboliques l' utilisent (64). Il peut être stocké dans la ferritine (Ft), mais la majeure partie est transférée dans la circulation sanguine après passage du pole basal de l'entérocyte via un exporteur nommé ferroportine (FPN1a = SLC40A1). Le fer est re-oxydé en Fe^{3+} par l'héphestine, une enzyme

cuivre dépendante, avant de se lier à la transferrine (Tf), la protéine de transport du fer dans le sang (*Fig. 6).*

2.1.2 Distribution et recyclage

Ce fer lié à la transferrine est ainsi distribué à l'ensemble des tissus de l'organisme (65). Le foie constitue l'organe de stockage principal du fer (10-20% chez les sujets sains) sous forme de ferritine. La ferritine se compose de deux sous-unités: *heavy/heart* (H) et *light/liver* (L), dont la proportion varie selon le tissue considéré (*Fig. 6)*. Le principal organe consommateur de fer (70%) est la moelle osseuse pour la synthèse de l'hémoglobine érythrocytaire avec la participation de l'enzyme *5-aminolevulinic acid synthase 2* (ALAS2) après internalisation par l'intermédiaire du récepteur de la transferrine (*Transferrin Receptor* 1, TfR1) *(Fig. 7*). La concentration de TfR1 est régulée par le niveau de fer, et la pression partielle en oxygène via les facteurs de transcription de réponse à l'hypoxie (*Hypoxia Inducible Factor* - HIF). Le fer restant est distribué aux autres tissus dont une majorité liant la myoglobine du muscle strié.

La capacité d'absorption intestinale journalière est limitée, de l'ordre de quelques mg tout au plus. Elle couvre les besoins de l'organisme en l'absence de situation pathologique. Cela est dû à un système de recyclage efficace du fer des globules rouges faisant intervenir les macrophages (*Fig. 6)*. Les érythrocytes sénescents sont phagocytés par les macrophages (processus d'érythrophagocytose) de la rate et du foie principalement. L'hémoglobine est catabolisée par l'*hème oxygénase-1* (HO-1) libérant du fer qui est excrété des macrophages par la ferroportine et refixé à la transferrine circulante après oxydation par une enzyme similaire à l'héphestine: la ceruloplasmine. Les réserves de fer hépatique constituent une autre source de fer disponible.

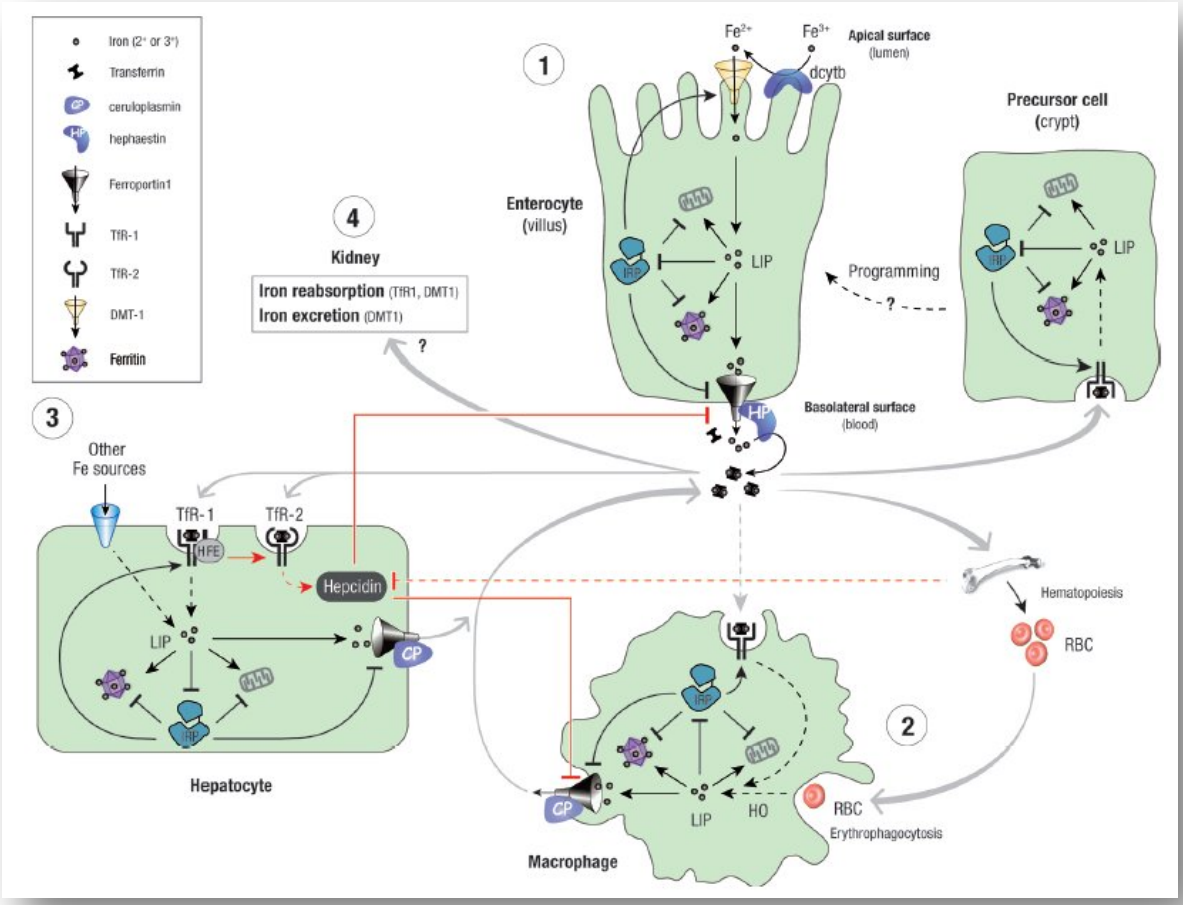


Figure 6: Les flux du fer dans les différents types cellulaires. *1: les entérocytes, 2: les macrophages, 3: les hépatocytes et 4: les cellules rénales. D'après Muckenthaler et al, Ann. Rev. Nutr., 2008.*

2.1.3 Régulation

Les faibles variations de la concentration en fer au niveau d'un organisme, par l'absence d'import et d'export massifs, imposent l'existence de systèmes de régulation. L'homéostasie du fer est ainsi maintenue grâce à deux systèmes complémentaires dont l'activité s'exerce à deux niveaux. D'une part une régulation systémique et d'autre part une régulation ubiquiste au niveau de chaque cellule.

La régulation du fer au niveau systémique est réalisée grâce à l'hormone appelée hepcidine. C'est un peptide produit et sécrété principalement par les hépatocytes (*Fig. 6)* ayant pour cible le seul exporteur cellulaire de fer connu à ce jour, la ferroportine. L'hepcidine cible principalement les entérocytes et les macrophages. La liaison de l'hepcidine induit l'

internalisation et la dégradation de la ferroportine, ce qui a pour effet d'inhiber la sortie du fer de ces cellules et donc d'induire une rétention du fer intracellulaire diminuant ainsi l'approvisionnement de fer circulant (66).

La régulation transcriptionnelle de l'hepcidine est complexe et sensible à plusieurs situations, non détaillées ici. L'augmentation de la concentration en fer circulant active la synthèse d'hepcidine Réciproquement, un déficit en fer, une situation d'anémie ou d'hypoxie la répriment (67). A noter que l'inflammation impacte aussi l'expression d'hepcidine.

2.2 Régulation cellulaire du fer: le système IRE-IRP

L'homéostasie cellulaire du fer implique des *trans*-éléments appelés *Iron Regulatory Proteins* se fixant à des motifs en *cis*, les *Iron Responsive Elements*, des séquences non-codantes des ARN messagers régulés (60). Ces éléments constituent le système IRE/IRP.

2.2.1 Structure et fonctionnement

Les *Iron Regulatory Proteins* 1 et 2 (IRP 1, IRP 2) sont des protéines cytosoliques, responsables de la régulation intracellulaire du fer en se liant aux *Iron Responsive Elements* (IRE) sur des séquences non traduites de certains ARN messagers. Ce contrôle post transcriptionnel concerne la traduction de gènes codant des protéines impliquées dans l'entrée du fer (TfR1, DMT1) dans les cellules, son utilisation (ALAS2, HIF 2α, aconitase mitochondriale), son stockage (FTH, FTL) et son exclusion (FPN1a) (*Fig. 7*) (68). Une régulation similaire d'autres gènes moins directement liés au fer est suspectée, mais généralement moins bien établie (69). En effet des connexions de ce système régulateur avec des fonctions cellulaires distinctes de l'homéostasie du fer sont illustrées par le fait que certains ARNm portant des IRE et régulés par les IRP n'ont pas de rapport évident ou immédiat avec la prise en charge du fer, comme par exemple les transcrits codant pour CDC14A intervenant dans le cycle cellulaire (69).

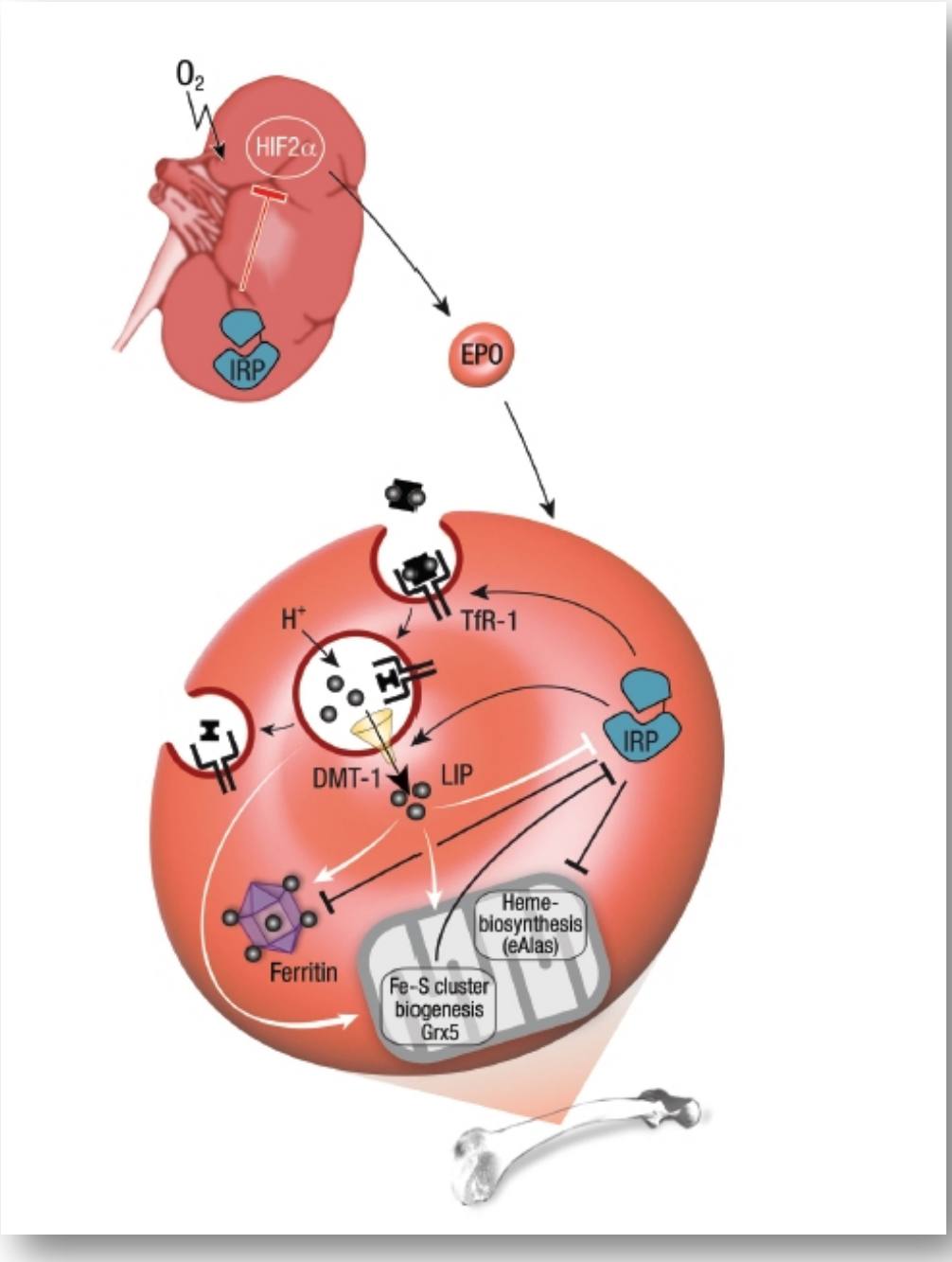


Figure 7: Le fer et son système de régulation IRP/IRE au niveau des érythroblastes.

D'après Muckenthaler et al, Ann. Rev. Nutr., 2008.

Les IRP sont des protéines appartenant à la famille des aconitases. IRP 1, sous sa forme cis-aconitase cytosolique, présente cette activité de conversion réversible du citrate en isocitrate. IRP 1 contient alors un cluster fer – soufre ([4Fe-4S]) dont trois atomes de fer sont liés par des cystéines et le quatrième fixe le substrat (70). Sous cette forme IRP 1 ne peut pas lier les

IRE. On retrouve cette configuration de l'holoprotéine lorsque la quantité de fer est suffisante. A l'inverse en situation de carence en fer, le cluster n'est pas assemblé (ou est dissocié) et l'apoprotéine peut lier les IRE. Donc en fonction des disponibilités en fer et d'autres conditions ou signaux qui modulent l'activité IRP, il semble exister un équilibre entre les deux formes de la protéine dont la concentration totale varie peu et dont la forme aconitase constitue généralement la configuration prépondérante.

Contrairement à IRP 1, IRP 2 ne présente pas d'activité aconitase. Son mode de dégradation, est également différent car en présence de fer et d'oxygène, la protéine FBXL5 du complexe SKP1-CUL1-FBXL5 lie le fer par son domaine hémérythrine, ce qui a pour effet de stabiliser le complexe et d'induire l'ubiquitination et la dégradation protéasomale d'IRP 2 (71-73). Cette E3 ubiquitine ligase est donc sensible au fer et la dégradation qu'elle coordonne s'effectue en réponse au statut redox (74, 75) et d'autres conditions (état de phosphorylation) qui nécessitent d'être clarifiées. Le mode de dégradation d'IRP 2 par le protéasome conditionne donc l'activité régulatrice de l'IRP.

Les IRE sont des structures dites en "épingle à cheveux" disposées dans les régions non codantes des ARN messagers régulés par les IRP. Après fixation de l'IRP à l'IRE, l'effet régulateur sur la traduction de l'ARNm est dépendant de la position de cet IRE. Un IRE positionné du côté 5' de la région codante (exemple: ARNm des sous-unités L et H de la ferritine) inhibe la traduction, alors qu'un IRE positionné en 3' de l'ARNm (exemple: ARNm du récepteur à la transferrine) le protège des ribonucléases et ainsi maintient un niveau de traduction élevé (*Fig. 8*). L'ARNm du récepteur à la transferrine possède la particularité de posséder cinq IRE en position 3'. A ce jour aucune autre cible du système IRE/IRP ne semble posséder plusieurs IRE.

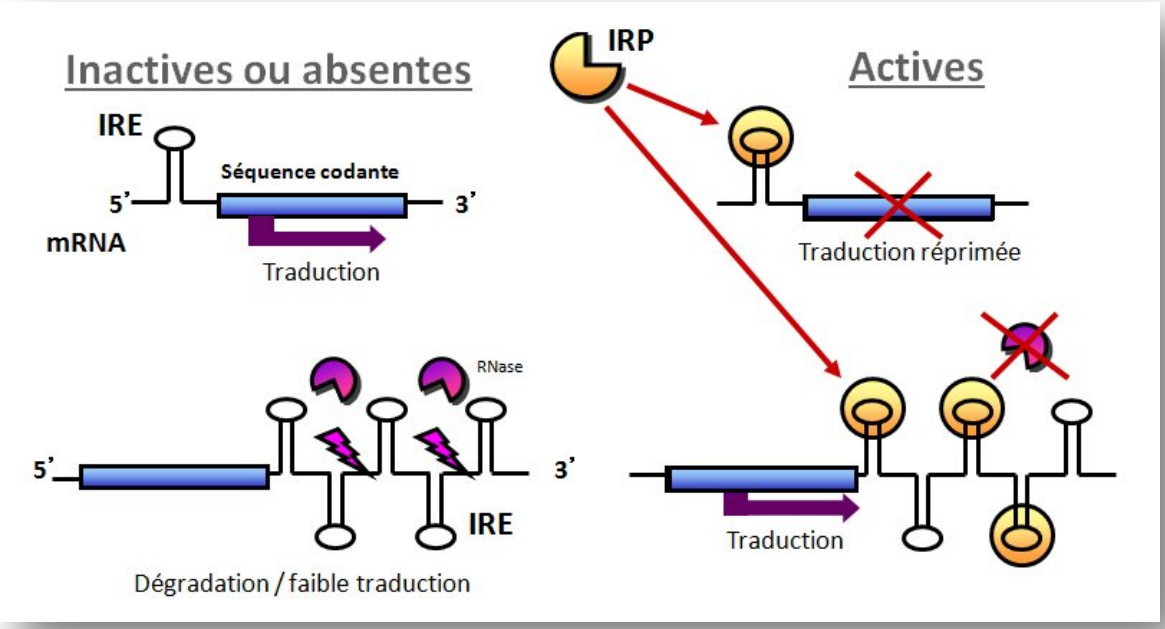


Figure 8: Fonctionnement du système Iron Responsive Element - Iron Regulatory Protein.

L'activation du système IRE-IRP, lors par exemple d'une carence en fer (*Fig. 9*), a donc un impact sur la régulation intra-cellulaire du fer, d'une part par la diminution de la traduction des sous-unité de ferritine et donc la limitation du stockage du fer, et pour certains types cellulaires par la diminution de la traduction de la ferroportine préservant le fer au niveau intra-cellulaire. D'autre part dans certaines cellules l'augmentation induite des messagers du transporter DMT1 et du récepteur de la transferrine favorise l'absorption et la pénétration du fer dans ces cellules. L'activation de ce système a également des répercussions dans d'autres voies de régulation, ainsi par exemple en cas de diminution de la concentration en fer, l'activation des régulateurs IRP réprime la traduction du facteur de transcription HIF 2α, modulant ainsi le niveau d'érythropoïétine responsable du contrôle du taux de globules rouges (*Fig. 6*). Ce mécanisme se superpose très probablement aux autres modes de régulation des facteurs HIF dans le cas spécifique d'HIF 2α.

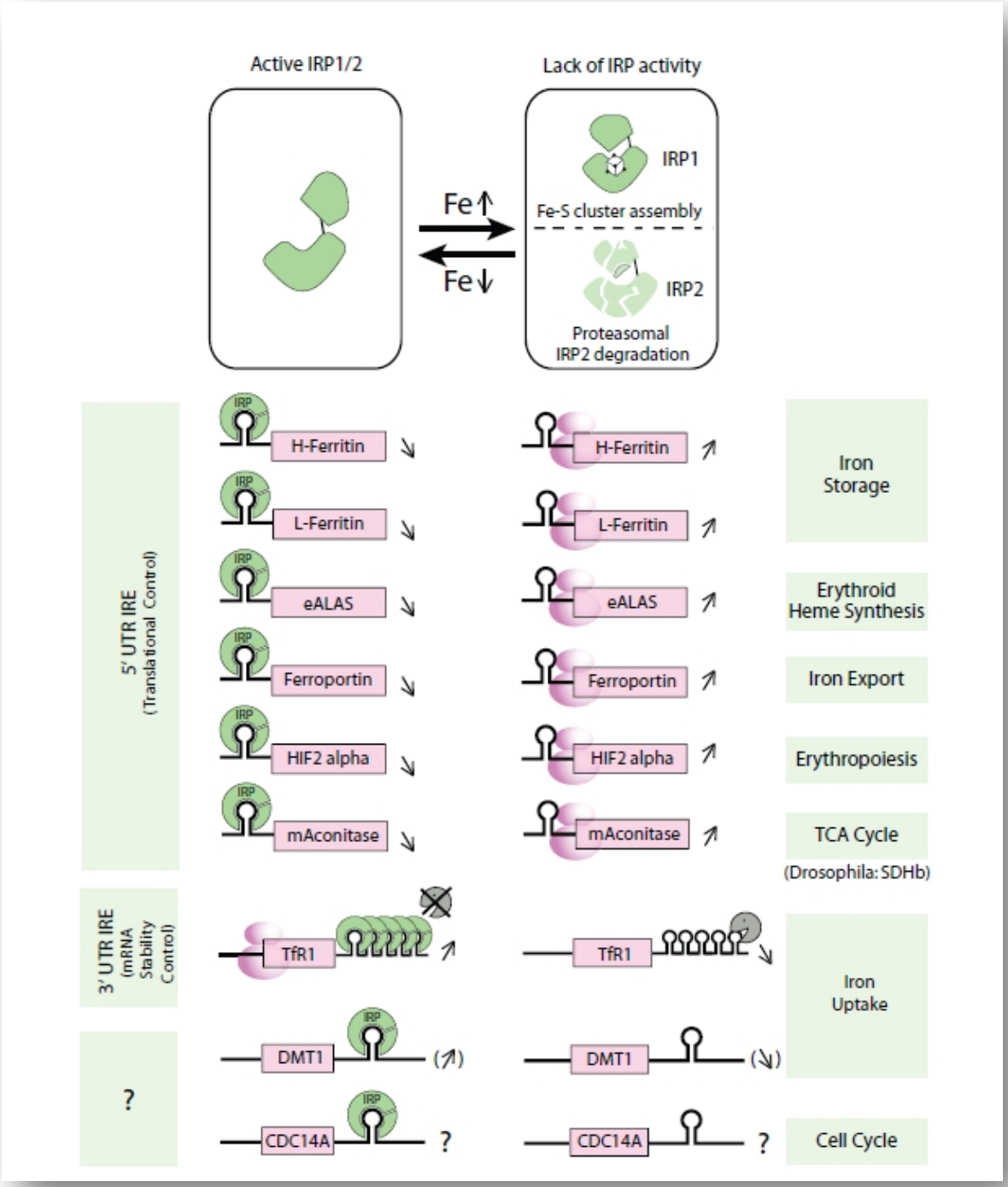


Figure 9: Conséquence de l'activation/inactivation des IRP sur la traduction des transcrits cibles.

D'après Muckenthaler et al, Ann Rev Nutr, 2008.

2.2.2 Autres stimuli du système IRE-IRP

L'activité IRP est régulée par le niveau de fer, mais de nombreux autres agents ou conditions peuvent affecter cette activité.

- *L'hypoxie:* La diminution de la pression partielle en oxygène aura pour conséquence d'inhiber la liaison de l'IRP à l'IRE, notamment pour IRP 1, mais accroit l'activité de IRP 2. Ainsi sous hypoxie, la liaison d'IRP 1 à HIF 2α est réduite, mais celle d'IRP 2 sur ses cibles est accrue. (76-78).
- *Le stress oxydant:* Par la génération d'espèces réactives de l'oxygène, dont le fer participe à la production, le stress oxydant tend à réduire l'activité des IRP et ainsi réduit le niveau intracellulaire en fer (79). Mais un effet biphasique (augmentation puis réduction) de l'activité d'IRP 1 sous l'effet de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) a également été caractérisé (80). L'inactivation des IRP lors de l'augmentation de la production intra-cellulaire d'ERO souligne les connexions de ce système régulateur avec le niveau des espèces oxydantes.
- *Les espèces réactives nitrés:* Le monoxyde d'azote active IRP 1 par la conversion de la forme aconitase (81) et l'ion nitrosonium l'inactive. Leurs effets sur IRP 2 sont controversés.
- *Autre:* Les variations d'autres agents de signalisation inter-cellulaire, comme des cytokines ou des hormones, influent aussi sur l'activité des IRP, par des mécanismes partiellement compris et souvent indirects.

2.2.3 Dysfonctionnement du système régulateur et pathologies associées

L'importance du système IRE-IRP a été confirmée, entre autres, par les expérimentations sur les modèles murins, pour lesquels le génotype IRP knock out (IPR 1 $^{-/-}$ IRP 2 $^{-/-}$) n'est pas viable (82). La mort des embryons démontre l'importance du système pour le développement. Les animaux pour lesquels un unique IRP (IRP 1 $^{-/-}$ ou IRP 2 $^{-/-}$) est manquant sont viables, suggérant la capacité d'un IRP à remplacer au moins partiellement l'autre (82, 83). Ces travaux ont montré qu'un déficit en IRP 2 (IRP 2 $^{-/-}$) était à l'origine d'une légère microcytose, d'une dérégulation de l'hématopoïèse et des troubles de la distribution du fer conduisant à une surcharge en fer pouvant aboutir à une neurodégénérescence, au moins dans l'un des contextes génétiques utilisés (84, 85).

La pathologie humaine la plus emblématique du dysfonctionnement du système IRE/IRP est l'hyperferritinémie, marqué par une ferritine élevée avec un taux de fer sérique normal ou bas. Dans cette pathologie plusieurs mutations peuvent être identifiées sur l'IRE de l'ARNm de la sous unité L de la ferritine, au niveau de la boucle reconnue par les IRPs (86). Ces mutations conduisent à une surexpression de la sous unité L par l'absence d'un blocage de la traduction (87). Cette pathologie se caractérise par une cataracte, sans aucune incidence au niveau hématologique.

Il a été identifié également chez un patient présentant une pathologie lié à la ferroportine et caractérisé par une surcharge en fer, une mutation en 5' des régions non traduites de l'ARNm de la FPN. Cette mutation induit une perturbation de l'expression de FPN (88).

L'implication d'un déficit d'IRP 2 dans des cas de protoporphyrinémie est suspectée en raison du phénotype observé chez les souris IRP 2 $^{-/-}$. On suspecte également d'autres anomalies du système IRE/IRP dans des pathologies moins spécifiques du métabolisme du fer, comme les maladies pulmonaires chroniques (exemple: BPCO) ou la maladie d'Alzheimer.

Le système IRP-IRE est actif dans les cellules hématopoïétiques où son importance peut varier suivant la lignée et l'état de maturation des cellules. Mais le système IRE-IRP intervient aussi dans les autres cellules, en particulier celles qui prolifèrent, comme les blastes des LAM, qui doublent leur besoins en fer lors de chaque division. Enfin, deux observations d'intérêt en cancérogenèse ont montré qu'IRP 2, en particulier un domaine spécifique de cette protéine (89), provoquait un accroissement de tumeurs implantées chez des souris immunodéprimées (90), alors qu'IRP 1 inhibait la croissance tumorale (91). L'importance de ces résultats pour les cellules hématopoïétiques normales ou malignes est inconnue, mais il apparait extrêmement intéressant d'en examiner la portée dans les leucémies.

3. RESEAU REGULATEUR DU FER ET RESEAU REDOX DANS L'HEMATOPOÏESE NORMALE ET LEUCEMIQUE

3.1 Le fer et son système régulateur IRE-IRP dans l'hématopoïèse normale

L'hématopoïèse qui correspond au processus de production de l'ensemble des cellules matures du sang à partir d'une quantité limitée de cellules souches hématopoïétiques médullaires comprend l'érythropoïèse, la granulopoïèse, la lymphopoïèse, la monopoïèse et la thrombopoïèse. Le fer et le système IRP interviennent principalement dans l'érythropoïèse car son rôle est particulièrement critique pour la lignée érythroïde qui consomme la majorité des ressources en fer pour la production de l'hémoglobine des globules rouges.

Pour satisfaire leurs besoins en fer, les érythroblastes expriment fortement TfR1 à leur surface. Cette surexpression est retrouvée à chaque stade de différenciation (92), à l'exception des phases ultimes quand l'hémoglobine n'est plus produite. Après internalisation du complexe Tf-TfR1, libération du fer et import cellulaire via DMT1, la majorité du fer est utilisée par la mitochondrie pour la biosynthèse d'hème. Les modèles animaux déficients en Tf, TfR1 ou DMT1, aboutissent tous à des phénotypes avec dérégulation de l'érythropoïèse, marquée par de sévères anémies. Comme mentionné précédemment, les souris IRP $2^{-/-}$ présentent une dérégulation de l'hématopoïèse et de la gestion cellulaire du fer (anémie microcytaire, protoporphyrie). Au niveau des cellules érythroïdes, ce manque en IRP 2 ne semble pas complètement compensé par IRP 1. Très récemment, il a été montré que les souris IRP $1^{-/-}$ présentaient également une dérégulation de l'hématopoïèse mais associé à une hyperproduction de globules rouges (polyglobulie). Cela suggère l'existence d'un rôle d'IRP 1 différent de celui d'IRP 2 dans l'érythropoïèse. L'absence d'IRP 1 n'est pas compensé par IRP 2 bien que selon l'âge de la souris une compensation par un facteur non identifié est observée (93). L'enzyme 5-aminolevulinic acid synthase 2 qui participe à la biosynthèse de l'hème dans les cellules érythroïdes est régulée par le système IRE-IRP. Cette régulation limite la génération d'hème en cas de réduction des disponibilités en fer. Le fer s'il n'est pas utilisé peut également être stocké via la ferritine au sein des précurseurs érythroïdes. Les deux sous-unités de la ferritine sont également sous le contrôle du système IRE-IRP. Les modèles murins confirment cette implication du système de régulation avec ferritine et ALAS2 surexprimées chez les souris déficientes en IRP 2.

FPN1a a également été observé dans tous les stades de l'érythropoïèse, conférant ainsi aux progéniteurs érythroïdes la capacité d'exporter le fer. De plus, l'expression variable des transcrits FPN1a durant la différenciation érythroïde témoigne d'une régulation importante du gène FPN1a dans les érythrocytes (94).

Si l'intervention du système IRE-IRP dans l'érythropoïèse ne fait aucun doute, une étude sur des cellules primaires murines suggère une intervention non linéaire de ce système durant le processus de différenciation érythropoiètique (95). En effet, ce système serait évincé lors de la différenciation terminale des progéniteurs correspondant à la phase de très forte demande en fer, avec notamment une expression des ARNm portant des IRE qui échappent au contrôle des IRP dans un processus qui n'est plus dépendant du flux de fer dans les cellules.

Concernant le système fer dans le processus hématopoïétique des autres lignées cellulaires, très peu d'informations sont disponibles, car bien qu'indispensable à la vie cellulaire, il ne participe pas à des réactions spécifiques qui appellent des explorations par des approches expérimentales dédiées. On peut cependant évoquer le travail de *Sposi et al*. à partir de progéniteurs hématopoïétiques dont la différenciation a été induite in vitro et qui révèle que l'expression d'IRP 2 est maintenue à toutes les étapes de la différenciation érythrocytaire, monocytaire, granulocytaire et mégacaryocytaire, alors que celle d'IRP 1 ne l'est qu'à toutes les étapes de la différenciation érythrocytaire (92). L'expression et l'activité des deux IRP sont cependant augmentées lors de la transformation des monocytes en macrophages.

3.2 Contrôle redox de l'hématopoïèse normale

Il existe un lien direct entre hématopoïèse, oxygénation et réseaux régulateurs sensibles aux conditions d'oxydoréduction. Cela peut être illustré notamment avec l'implication d'HIF 2α, cible du système IRP-IRE et inducteur de la production d'EPO par le rein en réponse à l'hypoxie. En effet, en situation d'hypoxie la cellule adapte en partie le métabolisme de l'organisme et la gestion du fer par l'intermédiaire des facteurs de transcription de la famille des *hypoxia inducible factor* dont HIF 1α et HIF 2α. Lors d'une faible oxygénation, l'action des prolylhydroxylases, enzymes fer et oxygène dépendantes, est inhibée. Cela réduit la liaison de HIF 1/2 à la protéine de *von Hippel-Lindau* et de ce fait stoppe la dégradation des HIF par le protéasome. La stabilisation des HIF conduit à leur accumulation et translocation dans le noyau, où en se liant à la sous unité β, ils forment un complexe, HIF 1 ou HIF 2,

capable de se lier aux *hypoxia responsive element* (HRE) et ainsi de réguler un grand nombre de gènes. Parmi ces gènes, le gène codant l'EPO figure comme une des cibles de HIF 2. En raison de la présence d'un IRE en 5' de l'ARNm, HIF 2 subit une seconde régulation post-transcriptionnelle, fer dépendante, par le système IRE-IRP (96). Ce système permet la régulation de l'EPO afin d'ajuster le nombre de globules rouges à la disponibilité en fer et ainsi d'obtenir des érythrocytes normochrome et normocytaire. Ce que confirme les modèles murins IRP $2^{-/-}$ par la présence d'une microcytose, bien qu'il soit aussi suggéré que le contrôle d'HIF 2 est une fonction majeure d'IRP 1 (93). Le gène codant TfR1 est aussi régulé par HIF en raison de la présence d'un motif HRE dans sa région promotrice.

D'autre part, les cellules souches hématopoïétiques prolifèrent dans la partie la plus hypoxique de la moelle (97, 98) et la différenciation suit grossièrement le gradient d'oxygène dans la moelle présent dans la niche hématopoïétique. Le potentiel redox, qui traduit l'équilibre entre espèces oxydantes et anti-oxydantes (réductrices) et agit comme effecteur spécifique de certains modules régulateurs, impacte donc directement la balance entre auto-renouvellement, différenciation et prolifération des CSH et contrôle ainsi le destin cellulaire.

L'oxygène participe majoritairement à la production d'énergie au niveau de la chaine respiratoire mitochondriale dont la réaction de réduction par les électrons, participant à la génération de potentiel transmembranaire, aboutit à la production d'eau. De nombreuses autres réactions catalysées par des dioxygénases requièrent de l'oxygène comme substrat. Les formes intermédiaires de la réaction de réduction de l'oxygène, nommées espèces réactives de l'oxygène (ERO) telles que l'anion superoxide, le peroxyde d'hydrogène ou le radical hydroxyle, sont des formes plus réactives que l'oxygène moléculaire et interagissent avec tous les composants cellulaires (protéines, acides nucléiques, lipides...).

Si l'équilibre redox est déplacé au bénéfice d'espèces oxydantes, telles que les ERO, cela aboutit à un stress oxydant provoquant des dommages irréversibles aux composants cellulaires. Pour contre-balancer ce déséquilibre il existe des systèmes réducteurs faisant intervenir le glutathion, les thioredoxines, les glutaredoxines, les vitamines, et d'autres molécules ou activités anti-oxydantes. Avant même d'atteindre un niveau d'oxydation favorisant les dommages cellulaires, de faibles variations du potentiel redox peuvent modifier le comportement cellulaire et ainsi changer le destin cellulaire via l'activation de facteurs de transcription et de cascades de signalisation. En effet, des facteurs de transcription comme FoxO3, GATA-1, NFE2 sont redox-sensibles. Le niveau d'ERO régule l'activation de ces

facteurs de transcription et joue un rôle déterminant dans l'engagement ou le déroulement des processus de maturation. En conséquence, la modulation des quantités d'ERO participe significativement à la régulation de l'hématopoïèse normale.

3.1 Relation entre l'équilibre redox, l'homéostasie du fer et leucémogenèse

Le fer est un élément indispensable à la croissance cellulaire. Les cellules cancéreuses requièrent donc des quantités de fer supérieures à d'autres cellules de même type car elles prolifèrent plus rapidement. Parmi leurs caractéristiques figurent une augmentation de la production de TfR1, donc d'un flux d'entrée de fer supérieur à celui de cellules normales, et un haut niveau d'expression de la *ribonucléotide réductase (RR)* qui témoigne d'un engagement dans le cycle cellulaire. Ces caractéristiques devraient en théorie les rendre plus sensibles à l'action des chélateurs du fer que des cellules non malignes, d'où le développement d'essais cliniques utilisant des chélateurs comme stratégie anticancéreuse.

De fait, il a été montré que la déplétion en fer arrête la croissance cellulaire et conduit à la mort cellulaire par apoptose (59). Cet effet se traduit par un arrêt du cycle au niveau de la transition G1-S. Les mécanismes impliqués sont d'une part l'arrêt de l'activité de la *ribonucléotide réductase*, une enzyme nécessaire à la duplication de l'ADN et utilisant du fer (*Fig. 10*). A noter que cette réaction enzymatique nécessite un apport d'électrons via la *thiorédoxine* ou *glutarédoxine* et ainsi correspond à un point de convergence de la gestion cellulaire du fer et de la régulation redox. Et d'autre part, la privation de fer influe sur l'expression des cyclines A, E et D du cycle cellulaire par l'intermédiaire de variations des kinases CDK2 et CDK4, et des inhibiteurs de CDK tels que $p16^{INK4}$, $p21^{WAF1/CIP1}$ ou $p27^{KIP1}$(99) (*Fig. 10*).

L'ensemble de ces effecteurs du cycle sont en relation avec d'autres régulateurs majeurs du cycle cellulaire tel que p53 et pRb (*Fig. 10*). Or il est établi que le mécanisme utilisant la voie de p53 à l'origine de l'arrêt du cycle cellulaire fait appel, à côté de son effet transcriptionnel bien documenté, à des processus mal identifiés qui réduisent la disponibilité en fer intracellulaire (58). De plus il y a une régulation potentielle de CDC14A par les IRP via son IRE en 3'. Lors d'une déplétion, il y a augmentation de l'ARNm de CDC14A, lequel déphosphoryle $p27^{kip1}$ et la cycline E nécessaire au passage en phase S (69).

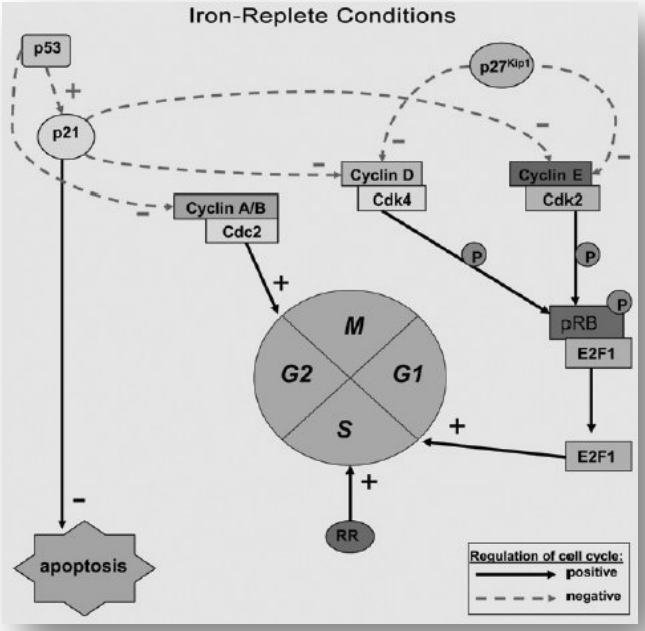


Figure 10: Système d'activation et de régulation du cycle cellulaire lors de condition de disponibilité en fer suffisante. *Cdk: cyclin dependent kinase; pRb: retinoblastoma susceptibility gene product ; RR: ribonucléotide réductase; P: phosphorylation. D'après Yu et al, Cell Cycle, 2007.*

Le rôle de l'homéostasie du fer sur l'équilibre mort cellulaire/prolifération est également modulé par des voies distinctes de celles impliquées dans le déroulement du cycle cellulaire. Ainsi, il a été observé une surexpression du gène REDD1 dans la lignée cellulaire K562 traitée par deferasirox. Cette surexpression conduit à une inhibition de la voie mTOR et donc de la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 aboutissant à une réduction de la prolifération cellulaire (100). Il a été également montré que le niveau de N-*myc down regulated gene* 1 (NDRG1), gène associé à des tumeurs moins agressives lors d'une surexpression dans certains cancers, est diminué chez les patients atteints de LAM par rapport à des donneurs sains. En présence de chélateur, NDRG1 est déréprimé. Cet évènement est associé à une reprise de la différenciation, mais également à un arrêt du cycle cellulaire en modulant notamment $p21^{WAF1/CIP1}$ (101).

La dérégulation de la gestion cellulaire du fer est également une cause majeure de stress cellulaire par la capacité de certaines formes chimiques du métal à générer et convertir des espèces réactives de l'oxygène. En conséquence, les dérégulations de la gestion du fer par les

cellules ont un lien direct avec la dérégulation des quantités d'ERO et donc des modules régulateurs qui y sont sensibles (102).

Les changements de l'équilibre redox participent à la leucémogénèse en déclenchant l'activation de ces modules régulateurs (35, 103). Ainsi il a été montré que FLT3-ITD et Ras, sont sensibles à l'augmentation du potentiel redox. Les duplications internes de Flt3 induisent une augmentation de la production NOX-dépendante des ERO, associée à une augmentation des cassures de l'ADN qui pourraient expliquer le caractère péjoratif de ces mutations (104). Parmi les autres possibilités, l'inactivation de la phosphatase PTEN par H_2O_2 pourrait favoriser l'activation de la voie AKT dans les LAM. La présence de la protéine de fusion RUNX-ETO, associée à t(8,21), entraine également une augmentation ERO-dépendante de la survie et de la prolifération des précurseurs hématopoïétiques. Dans la leucémogénèse, ceci peut être favorisé par une perturbation de l'activité anti-oxydante, notamment celle des facteurs de transcription FoxO impliqués dans la réponse anti-oxydante, la réparation de l'ADN et le destin cellulaire. La perturbation de FoxO est en lien avec l'activation de la voie AKT qui joue le rôle d'inhibiteur. De plus, dans les LAM, les blastes se distinguent par leur incapacité à se différencier, même en présence d'un niveau élevé d'oxygène. Ainsi le développement blastique apparait comme une déficience de détection, de réponse ou d'intégration des signaux induits par la pression partielle en oxygène et le niveau du potentiel redox.

L'exemple de l'impact de la surcharge en fer dans les syndromes myélodysplasiques (MDS) est particulièrement évocateur de ces liens entre homéostasie du fer, production d'ERO et hémopathies malignes. La surcharge en fer chez les patients polytransfusés induit une augmentation du stress oxydant participant très probablement à l'émergence du clone myélodysplasique et au déficit de l'hématopoïèse normale. La suspicion de la contribution du fer à la physiopathologie des MDS (105), notamment par l'accroissement du stress oxydant (106), et sa potentielle implication dans l'accélération vers la transformation en leucémie aigüe a conduit à la mise en place d'essais cliniques utilisant des chélateurs (deferoxamine, deferiprone ou deferasirox) comme traitement des MDS sur le long terme afin d'évaluer l'amélioration de la survie. L'impact bénéfique des chélateurs du fer et de la réduction concomitante des espèces oxydantes sur ces patients confirme ce rôle, même si les mécanismes de cette action thérapeutique sont encore incomplètement élucidés (107).

En outre, les études in vitro dans les MDS ont montré une réduction de la prolifération et de la viabilité des progéniteurs myélodysplasiques après traitement par deferasirox, accompagné d'une augmentation des ERO (108). Dans les LAM, il a été observé un arrêt de la prolifération des blastes leucémiques avec une augmentation de l'apoptose et un engagement dans la lignée monocytaire lors de la privation en fer des cellules leucémiques (109, 110). Ces observations furent confirmées par cette même étude avec un essai sur un patient (109). Cette carence induite s'accompagne d'une augmentation du niveau d'ERO et de l'activation des voies MAPK (Mitogen-activated protein kinases). L'ajout de vitamine D au traitement chélateur semble potentialiser l'effet. Et une étude rétrospective a récemment démontré l'effet potentiel de l'association chélateur (dans ce cas le deferasirox) et vitamine D sur l'amélioration de la survie des patients âgés dans la LAM (111).

4. INTERACTIONS DYNAMIQUES ENTRE RESEAUX BIOLOGIQUES : INTERET DE LA MODELISATION MATHEMATIQUE

L'essor des méthodes d'investigations cellulaire et moléculaire a mis en lumière un nombre considérable d'acteurs associés aux fonctions princeps des cellules normales. L'ensemble de ces acteurs qui peuvent exister dans plusieurs états, qui interagissent et s'influencent mutuellement définit des réseaux d'interaction moléculaire. Le système peut donc être vu comme un réseau d'interactions, et les dynamiques locales se combinent pour faire émerger une dynamique globale au niveau du système qui détermine le phénotype.

De manière générale les réseaux moléculaires d'intérêt en biologie sont des systèmes complexes, car leur évolution temporelle n'est pas nécessairement linéaire et de nombreuses boucles de régulation sont présentes. A cette complexité intrinsèque s'ajoute le fait que les connaissances disponibles sont souvent partielles et obtenues dans des conditions disparates pour prétendre "paramétriser" exhaustivement de tels systèmes à cette échelle. Pour gérer cette complexité une démarche contemporaine (dite de Biologie des Systèmes ou Intégrative) consiste à s'appuyer sur des outils de description et de modélisation mathématique qui permettent de raisonner rigoureusement sur des données expérimentales incomplètes, qualitatives ou hétérogènes. La procédure consiste à formaliser non seulement l'architecture des réseaux et leurs lois d'évolution, mais aussi toutes les données expérimentales disponibles sur leur comportement dynamique. Il s'agit donc d'un cadre unique permettant de décrire les connaissances sur la structure du système et sur sa dynamique.

Nos collaborateurs du laboratoire TIMC-IMAG (UMR 5525 CNRS) et du laboratoire VERIMAG (UMR 5104 CNRS) développent depuis quelques années une approche déclarative basée sur la Programmation Logique avec Contraintes (PLC), technologie issue de l'Intelligence Artificielle. Le modèle est conçu comme un outil dans une démarche expérimentale. Il est destiné à organiser et intégrer les résultats expérimentaux, à raisonner sur les données et les hypothèses, et à concevoir des stratégies expérimentales discriminantes en prenant en compte toutes les connaissances déjà acquises. Dans les modèles considérés les variables sont des concentrations (de protéines, d'ARN ou de métabolites par exemple), et les contraintes sont des relations (équations ou inégalités) entre ces variables. Les connaissances sont de deux types. Le premier est structurel, spécifiant quelle entité interagit avec quelle autre. La somme de ces données est résumée par un graphe d'interaction, statique dans le sens

où il contient l'ensemble des interactions possibles: il représente l'architecture des réseaux considérés. Le deuxième type de connaissances concerne le comportement observé du système, comme par exemple celui induit par une perturbation.

C'est avec cette nouvelle approche du problème que nous espérons à terme fournir une vision globale des différences fonctionnelles entre l'hématopoïèse normale et pathologique.

Objectif du travail de thèse

Comme nous venons de le voir, il apparait depuis quelques temps un lien, encore loin d'être parfaitement compris, entre la régulation de l'utilisation cellulaire du fer, l'équilibre d'oxydoréduction et la balance prolifération/différenciation des cellules leucémiques.

Ce présent travail a pour objectif d'évaluer les réseaux de régulation du fer et de l'équilibre redox dans les cellules leucémiques, afin de mieux définir les caractéristiques associées aux LAM qui permettent aux blastes de proliférer tout en diminuant leur tendance à se différencier. A plus long terme, l'étude de l'adaptation des cellules leucémiques aux modifications de ces réseaux devrait permettre d'identifier des stratégies thérapeutiques anti tumorales via une action sur les voies concernées.

Les objectifs furent donc

1. De déterminer l'état des médiateurs et des réseaux d'intérêt dans deux modèles de lignée leucémique humaine : KG1 et K562.
2. D'étudier le comportement de ces mêmes modèles biologiques après une perturbation simple, mais mimant une situation pathologique, correspondant à une carence en fer.
3. De comparer les résultats obtenus avec ces modèles biologiques à des cellules de donneurs sains.
4. Et enfin d'intégrer ces données expérimentales dans une démarche de modélisation pour dépasser le stade de la simple observation, et d'infléchir la démarche expérimentale, en retour, en fonction des enseignements acquis des modèles.

Matériels et méthodes

1. MODELES CELLULAIRES ET POPULATIONS ETUDIEES

1.1 Lignées cellulaires KG1 et K562

La lignée cellulaire KG1 est un modèle de leucémie aigüe myéloïde avec une prédominance de myéloblastes et promyélocytes (*Fig. 11*). Elle dérive d'une moelle de patient caucasien atteint d'une LAM secondaire. La lignée cellulaire K562 (*Fig. 11*) est un modèle de leucémie myéloïde chronique (LMC). Pluripotente, ces cellules sont dérivées d'une effusion pleurale chez une patiente en phase blastique d'une LMC. Ces lignées cellulaires ont été fournies par le centre d'exploration de l'hématopoïèse du Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble.

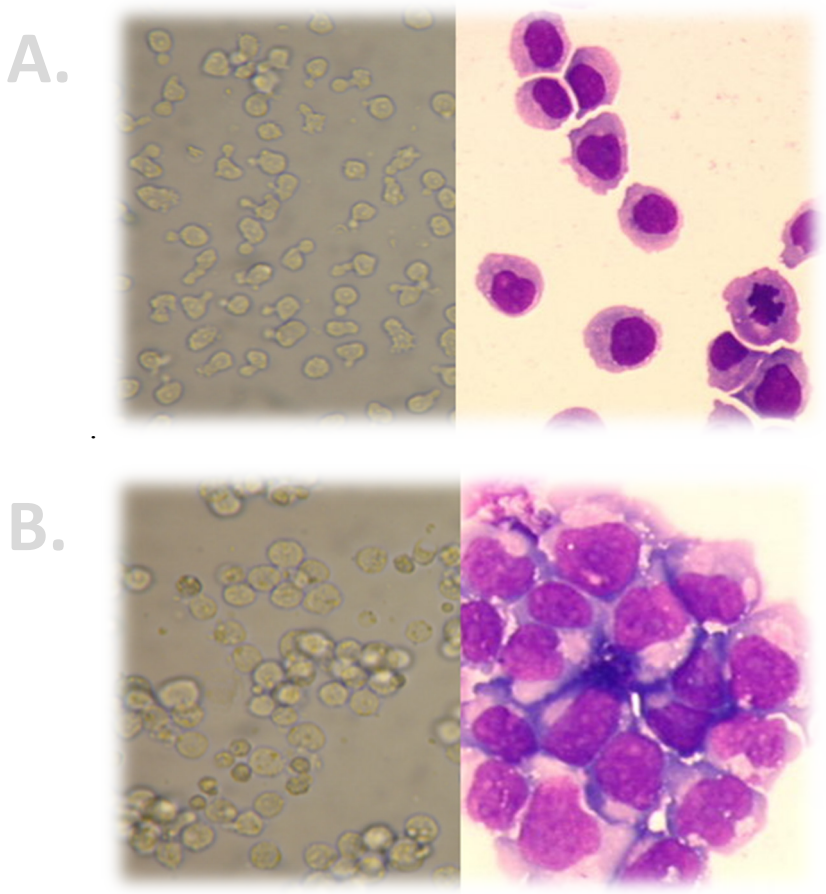


Figure 11: Observation au microscope optique des lignées cellulaires. *A: KG1 et B: K562, en culture (G x320) et après coloration au MGG (G x400).*

1.2 Cellules hématopoïétiques CD34+ de volontaires sains

Les cellules hématopoïétiques immatures (CD34+) utilisées pour comparaison des résultats de qPCR sont issues d'un donneur sain, de sexe féminin et âgé de 25 ans. Ce sont des cellules souches périphériques mobilisées et triées à l'Etablissement Français du Sang de Grenoble pour une allogreffe.

2. TECHNIQUES UTILISEES

2.1 Culture cellulaire

Pour l'amplification et l'entretien, les lignées cellulaires KG1 et K562 furent cultivées en RPMI 1640 (Gibco), 10% serum de veau fétal (SVF, Biowest, v/v), 1% pénicilline 10 000U - streptomycine 10mg/ml (v/v), 1% glutamine à 37°C sous 5% de CO_2. Les passages furent réalisés dès que la densité dépassait un million de cellules par millilitre et dilué d'un facteur deux afin d'obtenir une densité moyenne de 500 000 cellules par millilitre.

Dans le cas de traitement par deferoxamine (DFO, Sigma, ref.D9533-1G), les cellules furent incubées 20h à une densité de 500 000 cellules par millilitre dans un milieu RPMI 1640 sans SVF contenant 1% de bovine serum albumine dialysée (BSA, Sigma, p/v), 30nM de selenite de sodium, 1% pénicilline 10 000U-streptomycine 10mg/ml (v/v), 1% glutamine (v/v) et 200µM de DFO à 37°C sous 5% de CO_2.

Dans le cas des expérimentations après carence avec supplémentation en fer, les cellules furent incubées 20h à une densité de 500 000 cellules par millilitre dans le même milieu RPMI 1640 sans SVF avec différentes concentrations (0,5;1;2,5;5;15;25;50;125;625 nM) de transferrine humaine saturée en fer (Sigma, ref.T4132). L'incubation fut réalisée à 37°C sous 5% de CO_2.

Afin de limiter au strict minimum les apports de fer extérieur pour les expérimentations de carence par deferoxamine et de supplémentation en fer, la solution mère de transferrine à 12,5µM fut préparée à partir d'eau ultra-pure passée sur résine chelex (BioRad). De même, la BSA fut dialysée en utilisant cette eau ultra-pure et traitée.

2.2 Viabilité cellulaire et cycle cellulaire

Avant et après chaque traitement (par DFO ou supplémentation en fer), la viabilité fut déterminée après coloration au bleu trypan 0.1% (Sigma) par comptage manuel sur lame *FastRead*.

Afin de vérifier l'efficacité du traitement par DFO sur les cellules ou de déterminer l'effet de la supplémentation en fer sur le devenir cellulaire, l'analyse des phases du cycle cellulaire fut réalisée avant et après chaque traitement. Pour cela un million de cellules furent reprise par 300µl de PBS (Gibco) et fixées par 700µl d'éthanol 70% durant au moins une heure à 4°C. L'ADN fut ensuite marqué par iodure de propidium 10µg/ml (Sigma, ref.P4864) après 1h de digestion de l'ARN par RNAse A (Thermo Scientific, ref.EN0531) à 37°c. L'analyse fut effectuée par cytométrie en flux sur un cytomètre FACS *Calibur*™ou *LSRFortessa*™(Beckton Dickinson, laser Sapphire 488nm 100mW, BP 575/26 nm) et la déconvolution réalisée à l'aide du logiciel *ModFitLTv3.2*.

2.3 Quantification des transcrits

L'ARN cellulaire est extrait à partir de culots cellulaires de 3 à 5 millions de cellules ayant été conservés à -80°C. L'extraction fut réalisée en utilisant le kit *NucleoSpin RNA II* (Macherey-Nagel, ref.740955.50) selon les instructions du fabricant. L'ARN extrait fut quantifié par *Nanodrop* (Labtech France).

La synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) fut réalisée à partir d'1µg d'ARN total dans un volume final de 20µl. L'ARN fut tout d'abord dénaturé en présence de 0,5µg d'oligod$(T)_{18}$ (Thermo Scientific, ref.SO132) à 70°C 5min dans un volume intermédiaire de 11µl. Puis à ce volume réactionnel on ajouta le tampon de réaction (Tris-HCl ph8.3 50mM, KCl 50mM, $MgCl_2$ 4mM, DTT 10mM), 1mM du mélange des 4 dNTP 10mM et 20 unités d'inhibiteur de RNAse (Ribolock RNAse inhibitor, Fermentas, EO0381) que l'on fit réagir 5min à 37°C. Finalement 200 unités d'enzyme M-MuLV reverse transcriptase (Euromedex, ref.09-11211) furent ensuite ajoutées pour la réaction de transcription inverse à 42°C durant 60 minutes avant inactivation à 70°C durant 10 minutes. Cette réaction fut effectuée sur le thermocycler *GeneAmp 2400* (Perkin Elmer).

La réaction de PCR quantitative fut réalisée sur le *C1000 Thermal Cycler CFX96 Real Time System* (BioRad) dans un volume réactionnel final de 10µl par condition d'une plaque 96 puits. Ce volume se compose de 3µl d'ADNc précédemment synthétisé et dilué au 30ème dans de l'eau DEPC et de 7µl du mélange suivant: 2µl de *HOT Pol EvaGreen®qPCR Mix Plus* (Euromedex, ref.A120-101P, composé de la sonde EvaGreen®, des dNTP, de la HOT Pol DNA polymérase, du tampon et de $MgCl_2$ 12,5mM) et 250 nM de chacun des primers (*Tableau VI,* Eurofins MWG Operon). Le cycle d'amplification fut le suivant: 95°C 15min pour activation de l'enzyme, 95°C 15s de dénaturation, 60°C 20s pour l'hybridation et 72°C 20s pour l'élongation. Ce cycle fut répété 40 fois et les courbes de fusion établies pour validation de l'amplification. Le gène de référence choisi pour la quantification relative fut le gène *hypoxanthine phosphoribosyl transferase* (hPRT). Les transcrits étudiés furent les suivants: *Ferritine sous-unité H* (FTH), *Ferritine sous-unité L* (FTL), *Ferroportine* (FPN1a), *Heme Oxygenase 1* (HO-1), *Heme Oxygenase 2* (HO-2), *Hypoxia inducible lipid droplet associated* (HILPDA), *Récepteur de la Transferrine 1* (TfR1), *Iron Regulatory Protein 1* (IRP 1), *Iron Regulatory Protein 2* (IRP 2), *Aconitase 2* (ACO2), *5-aminolevulinic acid synthase 2* (ALAS2), *Divalent Metal Transporter 1* (DMT1), *α-globine* (αGLO*), β-globine* (βGLO), *γ-globine* (γGLO), *récepteur de l'Epo* (EpoR). Pour la quantification absolue, une quantité connue de plasmide pGL3 Luciferase Reporter Vectors (Promega) fut ajoutée à chaque échantillon d'ADNc et la quantification déterminée à partir de l'amplification de l'ADN codant pour cette luciférase.

2.4 Identification et quantification protéique

2.4.1 Lysat cellulaire

Les culots cellulaires ont subi trois cycles de congélation-décongélation dans l'azote liquide avant ajout de tampon RIPA à 1% de NP40 (p/v), un cocktail d'inhibiteur de protéases (Sigma, ref.P8340) et des inhibiteurs de phosphatases (NaF 10mM, Glycerol-2P 10mM et NaVO3 0,5mM). Après 20 minutes dans la glace, les homogénats furent centrifugés 30 minutes à 8000g à 4°c. Le surnageant fut conservé et constitua l'extrait soluble. Le culot restant fut lysé de nouveau selon la méthode précédente et l'ajout d'1% de triton X100 (p/v). La concentration protéique fut évaluée par la réaction de *Lowry* en utilisant le kit *DC Protein Assay* (BioRad), à 750nm sur le lecteur Infinite M200 (Tecan).

Tableau VI: Séquences des amorces de qPCR

Gènes			Séquences	Bp
Homo sapiens ferritin heavy chain	**FTH**	Forward:	CGAGGTGGCCGAATCTTCC	
		Reverse:	GTTTGTGCAGTTCCAGTAGTGA	133
Homo sapiens ferritin, light polypeptide	**FTL**	Forward:	CAGCCTGGTCAATTTGTACCT	
		Reverse:	CCAGTTCGCGGAAGAAGTG	113
Homo sapiens solute carrier family 40 member 1 (SLC40A1)	**FPN1a**	Forward:	CACAATACGAAGGATTGACCAGT	
		Reverse:	ATCCCGAAATAAAGCCACAGC	107
Homo sapiens aminolevulinate, delta-, synthase 2	**ALAS2**	Forward:	CTACCCAAGGACCAAACTGTTC	
		Reverse:	GACCAGGGAGCTAGGCAGAT	202
Homo sapiens aconitase 2, mitochondrial (ACO2)	**ACO2**	Forward:	CCACTGTGACCATCTGATTGAA	
		Reverse:	CACGCCATATTTGGCACCTG	117
Homo sapiens transferrin receptor (p90, CD71) (TFRC)	**TfR**	Forward:	ACCATTGTCATATACCCGGTTCA	
		Reverse:	GGCCTTTGTGTTATTGTCAGCAT	115
Homo sapiens solute carrier family 11, member 2 (SLC11A2) (proton-coupled divalent metal ion transporter)	**DMT1**	Forward:	TCTACATTTGGGCAGTGGG	
		Reverse:	GATGGCAATAGAGCGAGTCAG	146
Homo sapiens aconitase 1, soluble (ACO1)	**IRP1**	Forward:	GATATGGGCGCTTACCATTTTCG	
		Reverse:	GGCACACCCGTAAAGTCCTG	184
Homo sapiens iron-responsive element binding protein 2 (IREB2)	**IRP2**	Forward:	CAATCCATCTGTCATGCTTGC	
		Reverse:	GGTAATACTCCACTTGAACTGAGG	144
Homo sapiens hemeoxygenase (decycling) 1 (HMOX1)	**HO-1**	Forward:	CAGTGCCACCAAGTTCAAGC	
		Reverse:	GTTGAGCAGGAACGCAGTCTT	112
Homo sapiens hemeoxygenase (decycling) 2 (HMOX2)	**HO-2**	Forward:	GGAGCGCAACAAGGACCAT	
		Reverse:	TCCTCCCAGTTTTCACCAAAGA	114
Homo sapiens hypoxia inducible lipid droplet-associated	**HILPDA**	Forward:	AAGCATGTGTTGAACCTCTACC	
		Reverse:	TGTGTTGGCTAGTTGGCTTCT	144
Homo sapiens erythropoietin receptor (EPOR)	**EpoR**	Forward:	CAATGAAGTAGTGCTCCTAGACG	
		Reverse:	CACCTCGTAGCGGATGTGA	130
Homo sapiens hemoglobin, alpha 1 (HBA1)	**αGlo**	Forward:	CTCTTCTGGTCCCCACAGACT	
		Reverse:	GGCCTTGACGTTGGTCTTG	76
Homo sapiens hemoglobin, beta (HBB)	**βGlo**	Forward:	CTCATGGCAAGAAAGTGCTCG	
		Reverse:	AATTCTTTGCCAAAGTGATGGG	180
Homo sapiens hemoglobin, gamma A (HBG1)	**γGlo**	Forward:	GGTGCAGGCTTCCTGGCAGA	
		Reverse:	GCTCTGAATCATGGGCAGTGAGC	185

2.4.2 Western blot

Après dénaturation à 95°c, 5 minutes, en présence de tampon de chargement avec 5% β-2-mercaptoéthanol (v/v), 40 µg de protéines furent chargées et séparées en gels 8% (pour IRP 1, TfR) ou 15% (pour Ft) SDS-PAGE, puis transférées sur membrane de PVDF. Après blocage en TBS-Tween 20 0.2% (v/v), 5 % lait écrémé (p/v), les membranes furent incubées 2h à température ambiante avec l'anticorps lapin anti-IRP 1 dirigé contre la protéine humaine recombinante (Don du Dr Jean-Marc Moulis, 1:500 (81)) ou l'anticorps lapin anti-ferritin (Rockland, ref. 200-401-090, 1:2000), ou l'anticorps lapin anti-Transferrin receptor (Abcam, ref. ab84036, 1:1000). Les membranes furent ensuite lavées en TBS-Tween 20 0.2% (v/v) avant incubation 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire chèvre anti-lapin *Horseradish Peroxidase* (HRP) (Bethyl, ref.A120-101P, 1:5000). La révélation fut effectuée avec le kit *Pierce ECL western blotting substrate* (Thermo Scientific) sur l'appareil de prise de vue *Fusion FX7* (Peqlab) et l' intégration des signaux avec le logiciel *Image J v1.47*.

2.5 Mesure de l'activité IRP endogène

2.5.1 Lysat cellulaire

Les culots de cellules fraiches, traitées ou non, furent repris par 25µl par million de cellules avec un tampon de lyse contenant de l'HEPES 10mM pH 7,3, KCl 40mM, $Mg(OAc)_2$ 3mM, un cocktail d'inhibiteur de protéase (BioBasic, ref.B5386), glycérol 5%, DTT 1mM et NP40 0.5% (p/v). Après 20 minutes dans la glace, les homogénats furent centrifugés 30 minutes à 8000g à 4°c. Le surnageant fut conservé et constitua l'extrait soluble. La concentration protéique fut déterminée par dosage Bradford en utilisant le réactif Protein Assay (BioRad).

2.5.2 RNA Electrophoretic mobility gel shift assay (= gel retard)

En utilisant le kit *LightShift Chemiluminescent RNA EMSA* (Thermo Scientific, ref.20158), la réaction d'interaction entre IRE biotinylée et les IRP endogènes apportés par 3 µg d'extrait protéique, fut réalisée en présence et en absence de 2% de β-mercaptoéthanol pour chaque condition. Avant réalisation de la réaction, 0,2µl d'IRE biotinylé 125nM doivent être dénaturés 2min à 80°C par condition, puis refroidis à 4°C et en parallèle un pré-run (45 minutes, 70V) d'un gel d'acrylamide 4% non dénaturant en TBE 0,5X doit être réalisé. Le

mélange réactionnel d'un volume final de 8µl fut composé d'un mélange de tampon REMSA 1X (10mM HEPES ph7.3, 20mM KCl, 1mM $MgCl_2$, 1mM DTT), KCl 20mM, glycérol 5%, et 200 unités d'inhibiteur de RNAse (Fermentas), auquel fut ajouté les 3µg d'extrait et plus ou moins 2% de β-mercaptoéthanol. Après 5min à 4°C, c'est l'IRE biotinylé qui fut additionné avant une incubation de 30min à 37°C. Il fut ensuite ajouté 0,8µl d'héparine par condition avant une seconde incubation de 5min à 37°C et ajout de 2µl de REMSA loading buffer 5X. Le produit de la réaction fut séparé par migration sur le gel d'acrylamide (90min, 65V), transféré sur membrane *Hybond™ N+* (GE Healthcare, 2h00, 200mA) puis, après séchage, fixé à cette membrane par réticulation UV (5min, 254nm, 4W). La détection fut réalisée à l'aide du kit C*hemiluminescent Nucleic Acid Detection Module* (Thermo Scientific, ref.89880, applications des instructions du fournisseur) utilisant de la streptavidine couplée à l'HRP. La révélation fut effectuée avec le kit *Pierce ECL western blotting substrate* (Thermo Scientific) sur le *Fusion FX7* (Peqlab) et l' intégration des signaux avec le logiciel *Image J v1.47*.

2.6 Mesure de la régulation IRE par activité luciférase

2.6.1 Transfection

En utilisant les kits *Amaxa®Cell Line Nucleofector®* (Kit R pour la lignée KG1 et Kit V pour la lignée K562, Lonza) et à l'aide du *Nucleofector II* (Amaxa Biosystem), deux plasmides furent transfectés ensemble dans chaque échantillon, traité ou non par deferoxamine au préalable. La transfection fut réalisée selon les instructions du fournisseur. L'un de ces plasmides correspond au plasmide pGL3 (Promega, *Fig. 12*) porteur d'une activité indicatrice luciférase de luciole (*Firefly*) dans lequel chacun des différents IRE fut cloné au site HindIII en aval du promoteur SV40 (don du Dr. Jean-Marc Moulis, CEA de Grenoble) - Les IRE étudiés ainsi furent ceux de FTH, FTL, ALAS2, HIF 2α, ACO2, FPN1a et DMT1. Pour chacune de ces constructions plasmidiques, une version avec l'IRE en position inverse fut élaborée et transfectée en parallèle pour servir de témoin de l'activité indicatrice en absence de fixation des IRP. Dans chacun des échantillons 3µg de ce plasmide furent transfectés.

Le second plasmide transfecté (100ng/échantillon) dans chacune des conditions est un plasmide contrôle de la transfection (sans IRE): pGL 4.75 (Promega, *Fig. 12*), présentant une autre activité reportrice luciférase (*Renilla*). Après transfection, les cellules furent incubées

24h en culture dans 2 ml de RPMI 1640-10% SVF (Biowest, v/v)-1% pénicilline 10 000U - streptomycine 10mg/ml (v/v)-1% glutamine (v/v) à 37°C, 5% de CO_2.

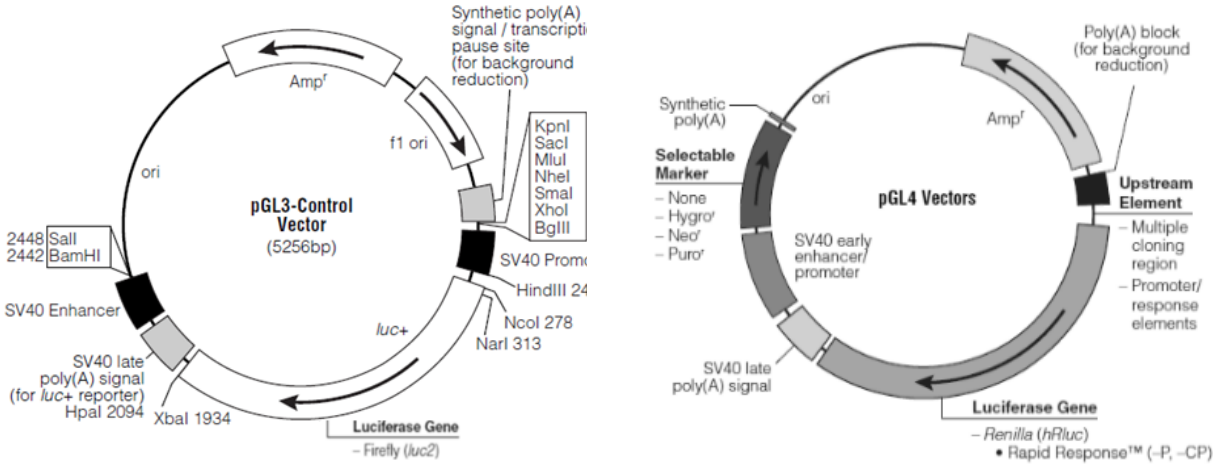


Figure 12: Structure des deux plasmides présentant une activité reportrice luciférase.

2.6.2 Mesure de l'activité indicatrice

Après 24h, la viabilité fut mesurée, les cellules numérées, et la mesure des deux activités luciférase fut réalisée avec le kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega, ref.E1980). Pour cela, les cellules furent récoltées, lavées deux fois au PBS puis lysées durant 15min à température ambiante avec 250µl de la solution Passive lysis buffer fournie dans le kit. Après centrifugation (2000g, 2min), 20µl du lysat furent transférés dans un puits d'une plaque 96 puits, auquel fut ajouté 100µl du réactif LARII pour mesurer l'activité luciférase *firefly*. Ensuite, 100µl du réactif Stop & Glo furent ajouté pour inhiber l'activité *firefly* et révéler l'activité luciférase *renilla.* Les fluorescences furent mesurées sur le lecteur *Infinite M200* (Tecan).

Pour l'interprétation, le rapport de la valeur *renilla* du clone IRE en sens inverse (IRE[-]) sur la valeur *renilla* du clone IRE (IRE [+]) fut calculé. Ce rapport devant être proche de 1 pour comparer des échantillons dont l'efficacité de transfection est similaire, les mesures au-dessus et en-dessous de 1±0.25, n'ont pas été prises en compte. Les valeurs de *firefly* furent ensuite normalisées sur ce rapport pour les deux constructions IRE[+] et IRE[-]. Et le rapport des activités *firefly* des transfections IRE[-] et IRE[+] fut calculé et correspond à une

quantification relative de la régulation de l'IRE considéré par les IRP endogènes. Les mesures furent finalement rapporté au nombre de cellules ou à la quantité de protéines.

2.7 Mesure du fer intra-cellulaire

Les mesures de fer intra-cellulaire furent réalisées par ICP-MS (Inductively coupled plasma mass spectrometry) sur l'appareil *XSERIES 2* (ThermoScientific) du laboratoire des éléments traces du Département de Biochimie et Toxico-Pharmacologie à l'Institut de Biologie et Pathologie (CHU Albert Michallon, Grenoble). Une prise d'essai de 100µl d'un lysat d'un million de cellule fut diluée au 25ème et mélangée à 1% d'acide nitrique (v/v) avant introduction dans l'injecteur avec le gallium 4.4mg/l comme étalon interne.

2.8 Mesure de la production intracellulaire des espèces réactives de l'oxygène

La production des espèces réactives de l'oxygène fut évalué en utilisant la sonde redox sensible: carboxy-dihydrodichlorofluoresceine diacétate acetyle ester (carboxy-H2DCF-DA, Interchim). Après traitement DFO ou non, 1 ml de suspension cellulaire à 500 000 cellules par millilitre fut transférée dans une plaque 24 puits et 200µM de H2DCF-DA furent ajoutés au milieu durant 30 minutes à 37°C, 5% CO2. Les cellules furent ensuite analysées en cytométrie en flux à l'aide du FACS *LSRFortessa*™ (Beckton Dickinson, laser Sapphire 488nm 100mW, BP 525/50 nm).

2.9 Mesure de la peroxydation lipidique

La mesure fut réalisée sur $7{,}5.10^5$ cellules carencées ou non. Le culot de cellules fut repris dans 0,5 mL de réactif TBA (0,4% acide thiobarbiturique, 50% acide acétique glacial, 2 mM EDTA). Le mélange fut mis à incuber 60 minutes à 99°C, puis refroidi 10 minutes dans la glace et centrifugé 10 minutes à 4000g. La peroxydation lipidique fut mesurée en dosant la fluorescence dans le surnageant obtenu (λ_{ex} = 535 nm/ λ_{em} = 595 nm) sur le lecteur *Infinite M200* (Tecan). Un témoin négatif fut réalisé avec 0,5ml de mélange $7{,}5.10^5$ cellules, 50% acide acétique glacial et 2mM EDTA.

2.10 Mesure du glutathion total

Les cellules à analyser (6.10^5 cellules, non traitées et traitées par DFO) furent lysées dans 150µl d'acide chlorhydrique 10mM (HCl) par congélation et décongélation dans de l'azote liquide. Les protéines de 120µl de lysat furent précipitées par ajout de 30µl d'acide 5-sulfosalicylique (SSA) 6,5%. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, les échantillons furent centrifugés 15 minutes à 2000g et 4°C. Une courbe étalon de glutathion (GSH) fut réalisée en diluant une solution stock de 100mM de GSH dans de l'HCl 10mM afin d'obtenir des concentrations comprises entre 10 et 80nM (volume final 100µl), et en ajoutant 20µl de SSA 1,3% par standard. Une solution d'acide 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoique (DTNB) 10mM fut préparée dans le tampon phosphate de sodium, 143mM-EDTA, 6,3mM-pH 7.4. De même pour les solutions de NADPH 2mM et de GSSG réductase 8,5U/ml. Le réactif correspond au mélange de 200µl de DTNB, 340µl de NADPH et 1460µl du tampon phosphate de sodium, 143mM-EDTA, 6,3mM-pH 7.4. Le mélange réactionnel fut préparé en mélangeant 20µl/puits d'échantillon, de blanc (eau) ou de GSH pour la courbe étalon, suivi de 20µl de tampon et de 200µl de réactif. Le tout fut incubé 5 minutes à température ambiante. La réaction enzymatique fut amorcée par ajout de 40µl/puits de GSSG réductase et la quantité d'acide 5-thio-2-nitrobenzoique fut immédiatement mesurée par absorbance à 415nm pendant 2 minutes.

Résultats

Dans la première partie du projet qui est présenté dans ce document, nous nous sommes focalisés sur les acteurs principaux de l'homéostasie du fer au niveau cellulaire, dénommés « réseau fer » car en relation par le système régulateur IRP, dans deux lignées cellulaires différentes (KG1 et K562). Elles correspondent aux modèles de deux types de leucémies myéloïdes.

Ce réseau d'intérêt est le suivant: le fer extracellulaire lié à la transferrine (Tf) est la source de fer intra-cellulaire par l'intermédiaire du récepteur de la transferrine (TfR1). Le fer internalisé peut être consommé par la cellule pour ses besoins biosynthétiques, stocké dans la ferritine (Ft) ou potentiellement exporté grâce à la ferroportine (FPN1a). Les acteurs de l'homéostasie du fer que sont le récepteur de la transferrine, la ferritine et la ferroportine sont sous la dépendance des IRP qui inhibent la traduction de la ferritine et de la ferroportine et augmentent celle du récepteur de la transferrine. Les IRP sont eux-mêmes régulés par la quantité de fer disponible (*cercle bleu sur la figure 13*).

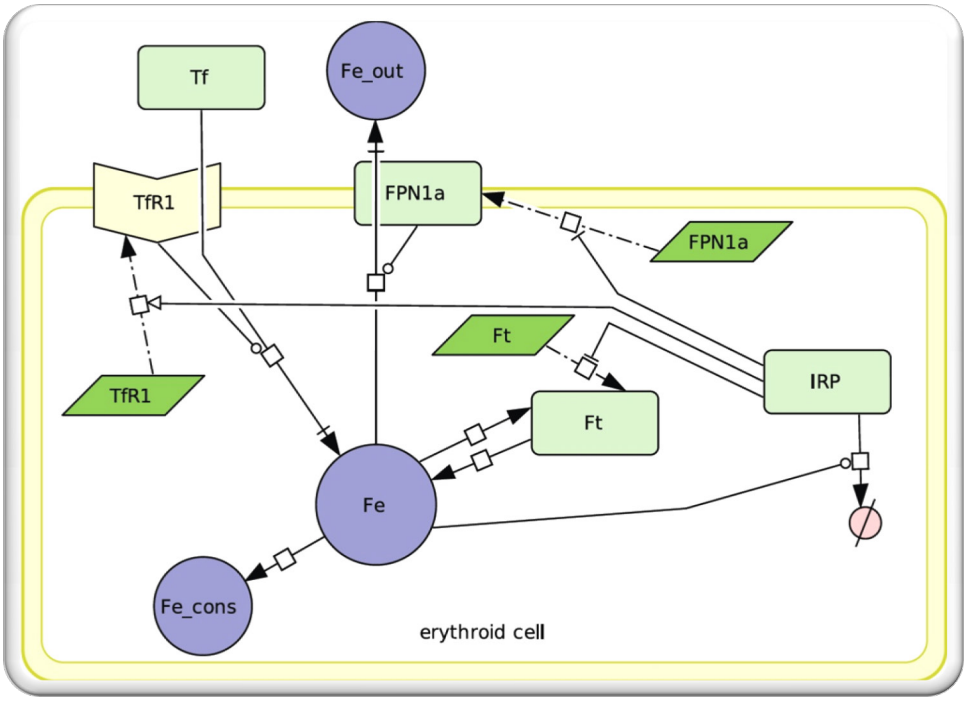


Figure 13: Schéma simplifié du réseau fer au niveau cellulaire. *Les rectangles correspondent à des protéines et les parallèlogrammes à des ARNm.*

Bien que les deux modèles leucémiques utilisés aient été développés dans les années 70-80, il n'existe pas de description exhaustive et quantitative du statut moléculaire, de leur réseau fer. Nous avons donc travaillé sur KG1 et K562 dans le but de déterminer une image de ce réseau pour des cellules dans un état de prolifération, tel que dans un processus leucémique, mais également en situation de carence en fer.

Notre projet a donc été de comparer dans un premier temps l'état de ce réseau entre les deux modèles, puis dans la seconde partie de notre projet, aux résultats obtenus chez des sujets sains. Cette démarche s'appuie sur un effort de modélisation des réseaux étudiés sur la base de nos données expérimentales, afin d'exploiter au mieux ces données dans un cadre théorique cohérent et offrant un caractère explicatif intégré concernant le comportement de ce type cellulaire.

.

1. IMAGE DU RESEAU FER DANS UN ETAT DE PROLIFERATION CELLULAIRE VERSUS UN ETAT DE CARENCE EN FER

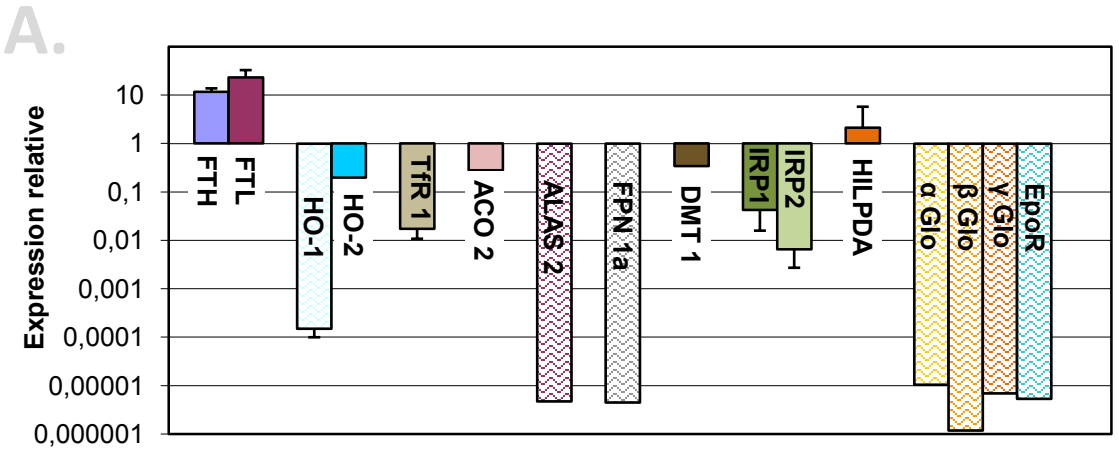
1.1 A l'échelle moléculaire

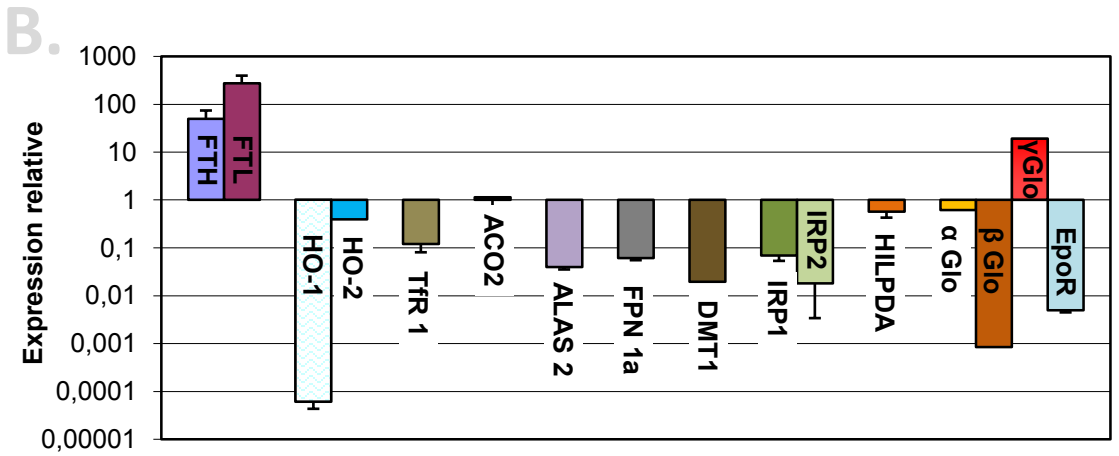
1.1.1 Mesure de transcrits: les cibles du système IRP

Nous avons effectué une quantification relative d'un certain nombre de transcrits du réseau fer mais également d'autres messagers corrélés à l'utilisation du fer, comme ceux codant pour les chaînes de globine, pour le récepteur de l'Epo, ou l'une des cibles du facteur de transcription HIF avec le gène HILPDA. Le gène de référence utilisé pour la quantification relative est l'*hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase*, dont l'invariance a été validée dans des expériences utilisant deux autres gènes de référence peu régulés (*acidic ribosomal phosphoprotein P0* - 36B4, et *glyceraldehyde phosphate dehydrogenase* - GAPDH).

De façon globale, on constate une similitude du profil des transcrits entre les deux lignées (*Fig. 14*). A l'état de base les transcrits ferritine sont d'un à deux ordres de grandeur plus abondants que le gène de référence (*Fig. 14A*). Les transcrits des deux hème oxygénases, du récepteur de la transferrine, de l'aconitase 2 mitochondriale et des IRP sont similaires entre les deux modèles. Cependant, certains transcrits considérés comme non détectés ou à la limite de la détection (barres hachurés) dans la lignée KG1 (*Fig. 14A*), sont présents dans la lignée

K562 (*Fig. 14B*). C'est le cas du récepteur de l'Epo, des chaînes de globine α, β et γ, de ALAS2 et de la ferroportine. A noter la forte représentation de la γ-globine chez K562 par rapport à la β-globine. On note également que DMT1, TfR1 et HILPDA diffèrent de 1 à 2 ordres de grandeur entre les deux lignées avec une quantité plus importante pour KG1 de DMT1 et HILPDA. Les transcrits FTH, FTL, HO-2, TfR, ACO2, IRP 1 et IRP 2, sont tous quantitativement plus nombreux dans K562 que dans KG1.





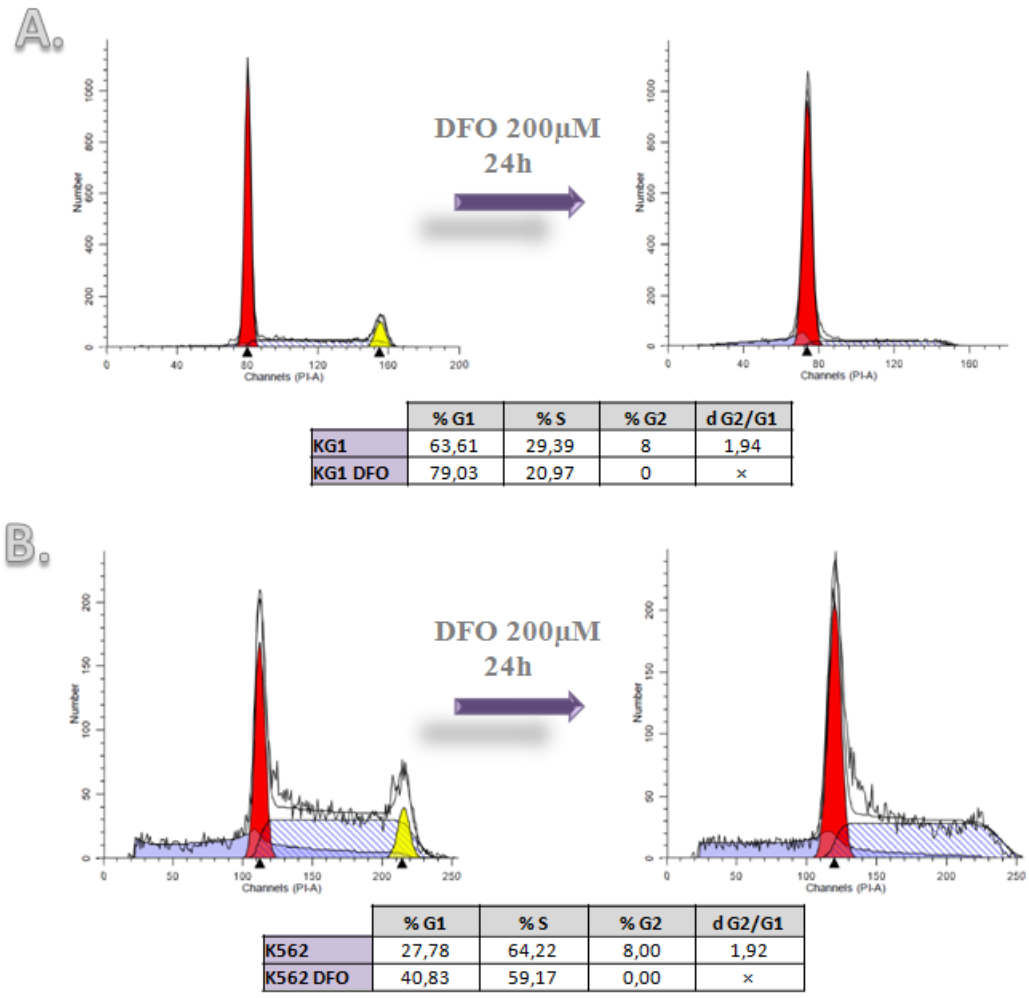
C.

ARNm	KG1 moyenne	KG1 écart type	K562 moyenne	K562 écart type
FTH	11,7	2,1	49,7	23,8
FTL	23,3	9,6	274	119,6
TfR1	0,017	0,011	0,12	0,16

Figure 14: Quantification relative des transcrits sélectionnés pour des cellules proliférantes.

A: lignée KG1, B: lignée K562, C: valeurs relatives et écarts types pour FTH/FTL et TfR1 (n=4 pour les cibles avec écarts types, sinon n=1).

Les mêmes cellules ont été carencées en fer durant 24h en présence de 200µM de deferoxamine (DFO, un chélateur) dans le milieu de culture. L'efficacité de la carence a été contrôlée par la mesure de la viabilité cellulaire après traitement au DFO associée à l'analyse du cycle cellulaire des cellules avant et après ajout de DFO. La carence fut considérée comme effective lorsque l'on observait une stabilisation ou diminution du nombre de cellules après traitement par DFO, associée à un blocage marqué du cycle cellulaire en G0/G1 se manifestant par une perte du pic G2/M (*Fig. 15A, 15B*).



	% G1	% S	% G2	d G2/G1
KG1	63,61	29,39	8	1,94
KG1 DFO	79,03	20,97	0	×

	% G1	% S	% G2	d G2/G1
K562	27,78	64,22	8,00	1,92
K562 DFO	40,83	59,17	0,00	×

Figure 15: Cycle cellulaire des modèles cellulaires avant et après ajout de deferoxamine 200µM durant 24h. *A: Lignée KG1 et B: lignée K562. En rouge la déconvolution de G0/G1, en jaune celle de G2/M et entre les deux (partie hachurée) la phase S.*

En moyenne, la perte cellulaire est estimée à 12% pour KG1 et 14% pour K562. Cependant les variations de la perte cellulaire d'un traitement à l'autre sont très grandes. Ainsi on a pu voir pour le même traitement DFO (200µM ; 24h) avec des cellules à la même densité (500 000 cellules/ml) des variations de +20% de croissance cellulaire à 65% de perte cellulaire et avec un cycle cellulaire contrôlé et validant un blocage de la croissance cellulaire. Cependant respectant les mêmes conditions nous n'avons pas toujours obtenu un blocage de croissance, cette variabilité étant plus fréquente pour KG1 que pour K562. Nous avons donc utilisé le cycle cellulaire comme critère principal pour juger de l'efficacité du traitement DFO.

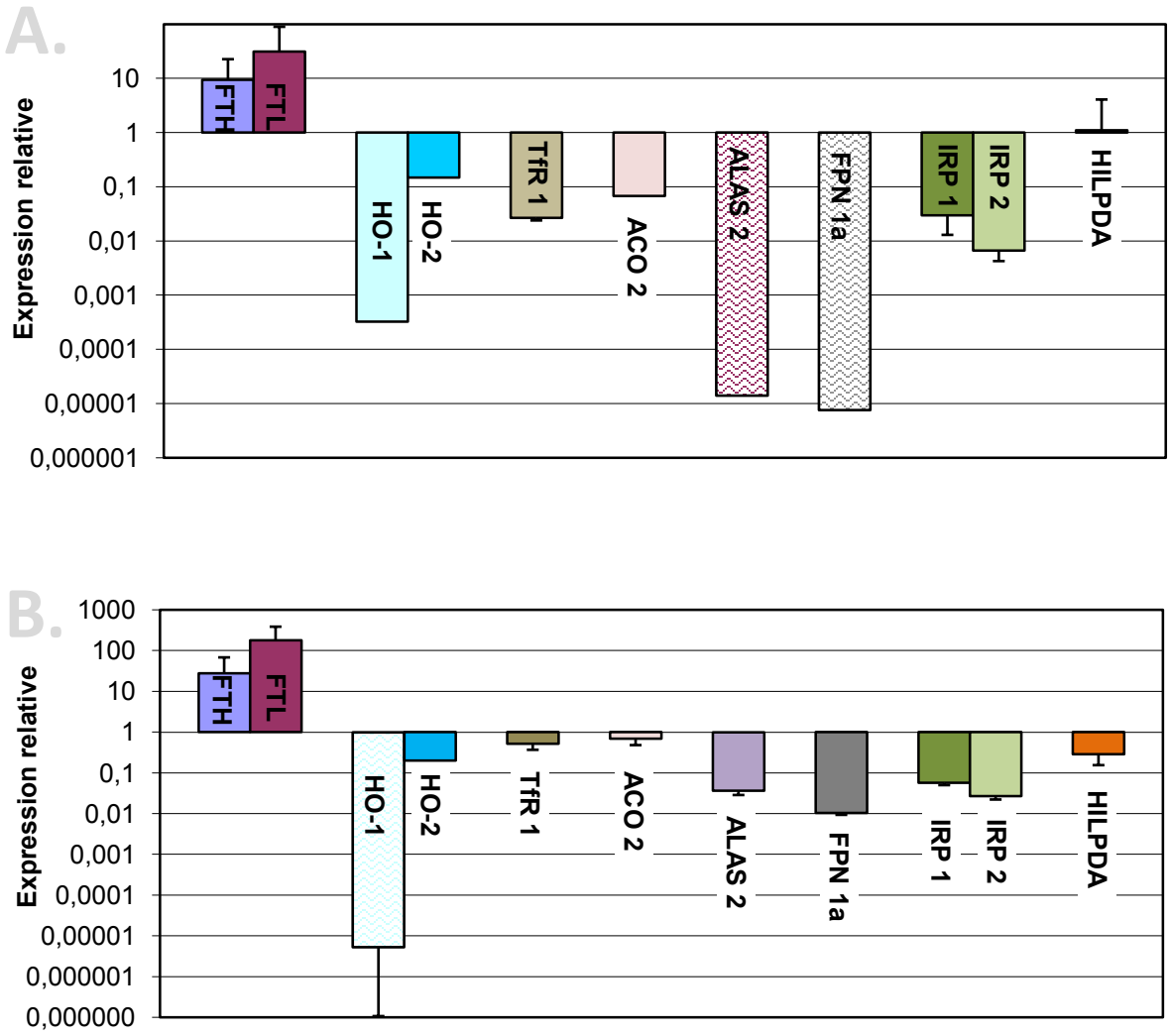


Figure 16: Quantification relative des transcrits sélectionnés pour les modèles cellulaires après carence de 24h en présence de 200µM de deferoxamine.

A: KG1 et B: K562 (n=4 pour les cibles avec écarts types, sinon n=1).

Après carence, les cellules des deux lignées cellulaires, bloquées dans leur croissance, montrent toujours des profils de quantification relative similaires (*Fig. 16*). Les transcrits ferritine (FTH et FTL) restent quantitativement les plus représentés. Les transcrits du récepteur de l'Epo et des différentes globines d'ALAS2 et FPN1a sont toujours à la limite de détection dans la lignée KG1. Les transcrits FTH, FTL, HO-2, TfR, ACO2, IRP 1 et IRP 2, restent quantitativement plus nombreux dans K562 que dans KG1, et inversement pour HILPDA.

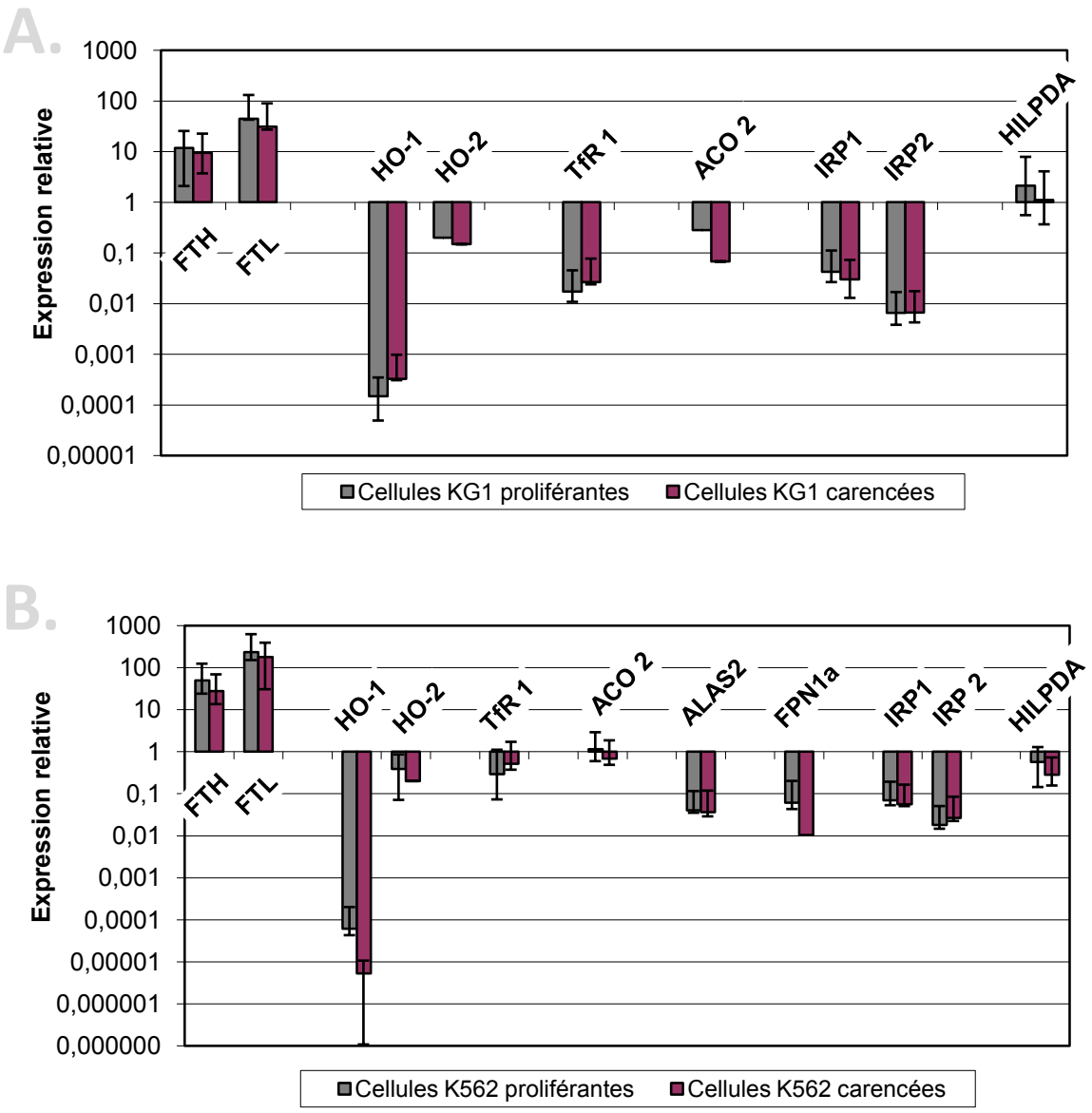


Figure 17: Bilan comparatif des quantifications relatives des transcrits entre cellules proliférantes et cellules dont la croissance est bloquée.

A: KG1 et B: K562. Les transcrits ALAS2 et FPN1a sont indétectables pour KG1.

Les différences de quantité de transcrits avant et après carence (*Fig. 17A, 17B*) sont faibles. Toutefois on note une évolution pour chaque transcrit dans les deux lignées. Ainsi, après carence, les messagers FTH, FTL, HO-2, ACO2, IRP 1 et HILPDA diminuent, alors que ceux de TfR1 et IRP 2 augmentent. Pour K562, les transcrits de la ferroportine sont diminués après chélation et ceux d'ALAS2 restent stables. Cependant toutes les différences observées ne peuvent pas être considérées comme significatives pour aucun des deux modèles cellulaires.

Nous avons ensuite comparé les données obtenues pour nos deux lignées cellulaires avec celles de cellules CD34+ de volontaire sain (un seul échantillon disponible), donc des cellules souches immatures non pathologiques (*Fig. 18*). On constate une similitude qualitative du profil des transcrits avec des taux de transcrits des deux sous-unités de ferritine, de HO-2 et des deux IRP équivalents à ceux des lignées leucémiques. Ceux de TfR1, ALAS2, EpoR et FPN1a correspondent à ceux de K562, alors que celui d'HO-1 reste très marginal comme pour les lignées. Les transcrits ACO2 et DMT1 diffèrent quelque peu quantitativement par rapport aux lignées. Les différences majeures observées sont l'absence de détection de HILPDA, représentée par le marquage hachuré orange de la figure 18 et l'expression des transcrits des globines comme K562 bien que cette expression soit qualitativement différente (majorité d'α-globine).

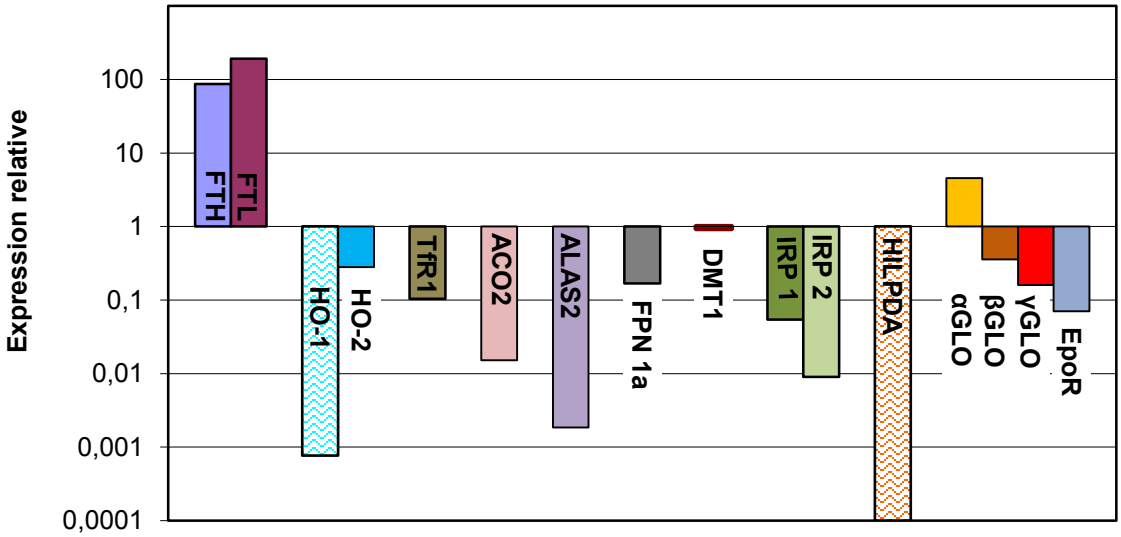


Figure 18: Quantification relative des transcrits du réseau fer de cellules CD34+ de sang périphérique provenant d'un donneur sain.

1.1.2 Les effecteurs du système IRP: régulation opérée sur les IRE par les IRP

Dans le but de déterminer si le système IRP régule l'ensemble des cibles IRE de la même manière dans les deux modèles cellulaires considérés, une activité indicatrice luciférase, sous la dépendance de chacun des IRE testés (IRE de FTH, FTL, ACO2, HIF 2α, DMT1, ALAS 2 et FPN1a), a été mesurée après transfection des cellules par un plasmide produisant cette enzyme. Pour chaque IRE, deux plasmides ont été construits, l'un dans lequel l'IRE est en amont de l'ADNc codant pour la luciférase de luciole (Firefly), l'autre dans lequel la séquence du même IRE à la même place est inversée, donc non reconnue par les IRP (témoin négatif). Un autre plasmide codant pour une autre luciférase (Renilla) a été co-transfecté comme contrôle de transfection. Les deux activités luciférase ont été enregistrées 24h après transfection, et les résultats sont rapportés après normalisation de l'efficacité de transfection par le rapport d'activité entre plasmide avec IRE anti-sens (non régulé) et IRE sens (fixant les IRP endogènes disponibles, avec donc une traduction de luciférase réprimée et une activité diminuée). Les mesures ont été effectuées sur les deux lignées sur cellules proliférantes mais également sur cellules carencées.

Tous les rapports calculés sont supérieurs à 1 pour chaque IRE de chaque lignée et quelle que soit la condition (cellules proliférantes ou bloquées). Le maximum des rapports ne dépasse pas 10 pour les deux modèles. Bien que des valeurs soient globalement plus élevées pour K562 que KG1, la régulation est qualitativement identique entre les IRE des différentes lignées pour cellules en croissance ou carencées. Nous n'observons donc pas de différence significative de l'efficacité de régulation des IRP sur les IRE.

1.2 A l'échelle protéique

1.2.1 Mesure de l'activité des protéines IRP

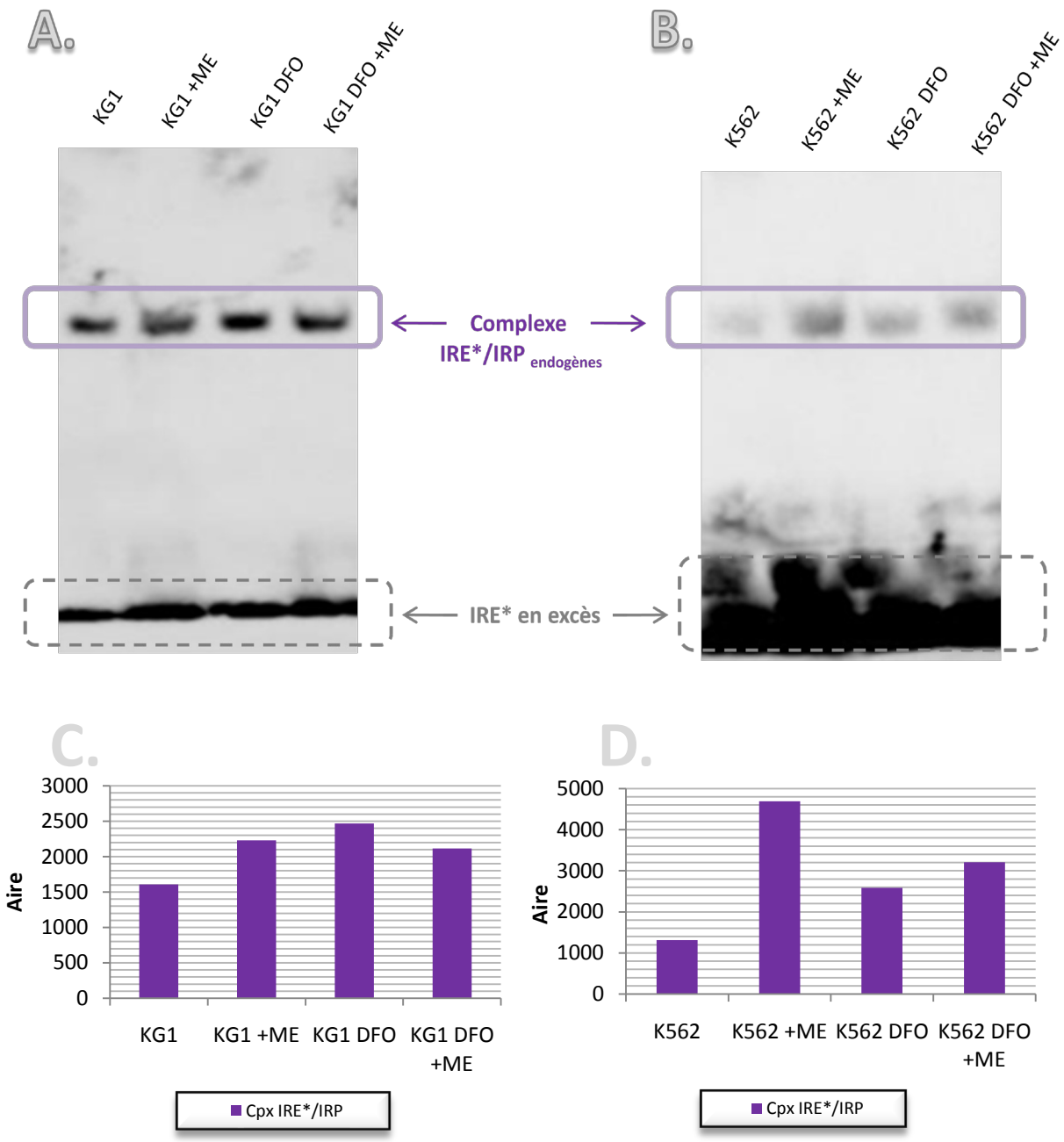


Figure 19: Détermination de l'activité IRP globale avant et après carence ferrique par gel retard. *A: lignée KG1 et B: lignée K562. L'ajout de β2-mercaptoéthanol (ME) révèle l'activité totale IRP potentiellement mobilisable. Les différentes bandes des gels retards ont été intégrées et représentées graphiquement pour KG1 (C) et K562 (D).*

Pour les deux lignées, un signal correspondant à la formation d'un complexe entre l'IRE biotinylée et les IRP endogènes a été observé pour chacune des conditions (*Fig. 19A, 19B*).

Le β2-mercaptoéthanol déplace les cystéines ligands du cluster Fer-Soufre d'IRP 1 et induit ainsi le passage de la forme aconitase à la forme fixatrice des IRE. Le signal avec β2-mercaptoéthanol marque la totalité d'IRP activé : on en déduit le pourcentage d'activation en l'absence de β2-mercaptoéthanol dans les différentes conditions.

En condition de croissance c'est donc 72% des IRP qui sont activés pour la lignée KG1 (*Fig. 19C*) contre 28% pour K562 (*Fig. 19D*). En conditions de carence, ce pourcentage d'activation passe à 100% pour KG1 et 81% pour K562.

1.2.2 Identification et quantification de protéines clés du réseau

Enfin la connaissance du réseau fer passe par la détermination de protéines d'intérêt telles que IRP 1, IRP 2, Ft, FPN, TfR1 ou HIF 2α, et de suivre leur évolution après carence en fer dans les deux modèles considérés (*Fig. 20*). Quand cela a été possible, certaines d'entre elles ont été quantifiées (Ft et IRP 1) pour relier ces informations à celles acquises au niveau des messagers.

Après traitement de 24h par deferoxamine 200µM, on constate une diminution moyenne (n=2) de respectivement 36,0% (+/-2,8%) et 38,0% (+/- 8,5%) pour KG1 et K562 de la protéine totale d'IRP 1, une diminution de 51,0% (+/- 3,0%) de la ferritine et au contraire une augmentation de 61,5 (+/-37,5%) et 51% du récepteur à la transferrine pour KG1 et K562 respectivement.

Nous n'avons à l'heure actuelle pas pu obtenir de résultat satisfaisant concernant les autres protéines (FPN1a, HIF 2α et IRP 2), faute d'anticorps spécifiques de bonne qualité.

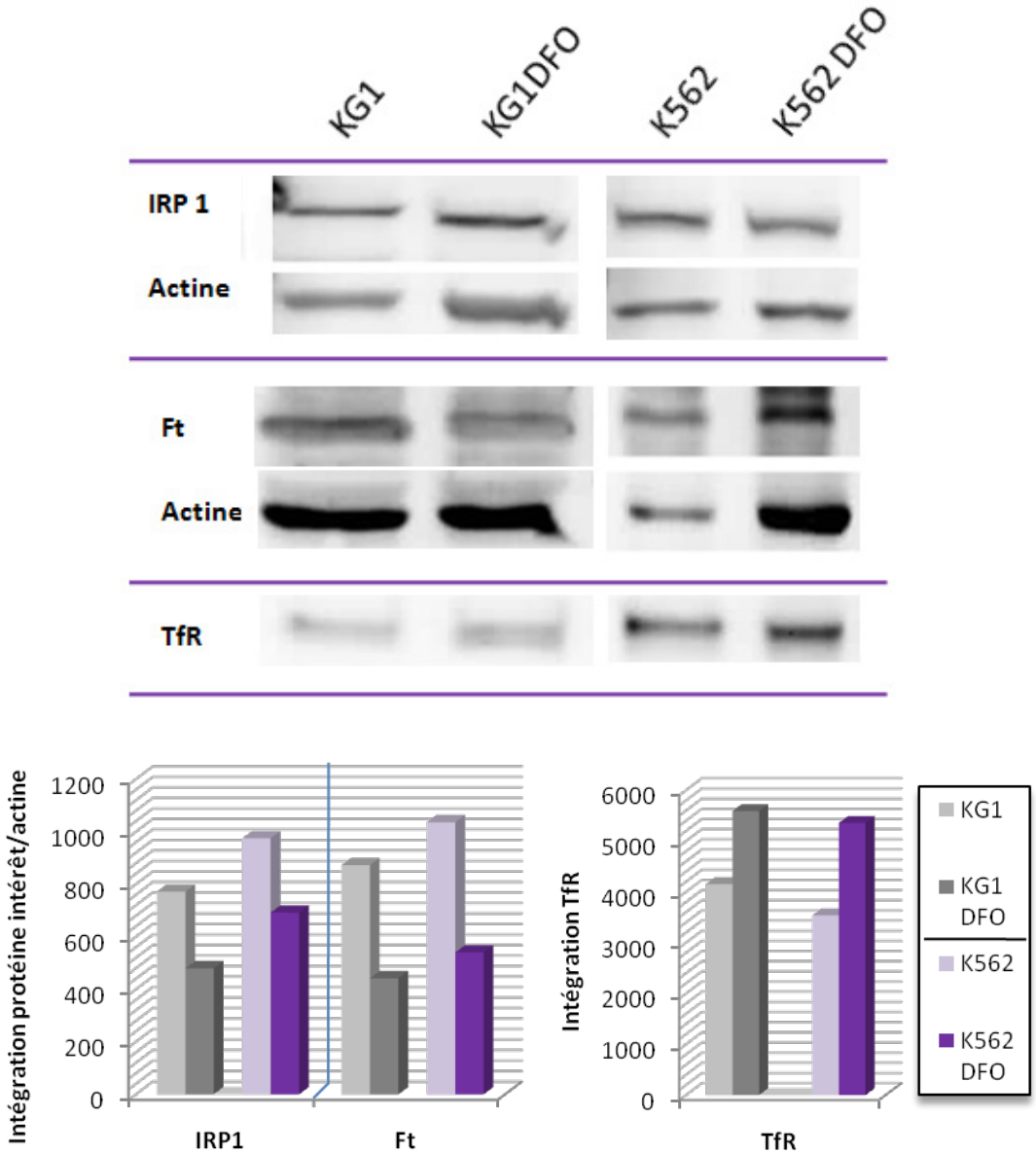


Figure 20: Identification des protéines d'intérêt du réseau fer par western blot pour les lignées KG1 et K562 en croissance et après traitement par DFO 200µM. *Intégration des bandes identifiées et normalisation par rapport à l'actine.*

1.3 Etat redox dans les modèles cellulaires

A l'aide de la carboxyH2DCF-DA qui pénètre dans les cellules on peut évaluer la production d'ERO dans la phase de croissance et en état de carence. La sonde est convertie en DCFH par l'action des estérases intra-cellulaires, puis oxydée par les espèces oxydantes en dichlorofluorescein, un fluorophore. La mesure de fluorescence par cytométrie (n=2) montre une diminution du pic de fluorescence (décalage vers la gauche, *Fig. 21*) entre les cellules en phases de croissance et des cellules carencées dont la croissance est bloquée. Ces résultats sont similaires pour les deux lignées. Cela correspond donc à une diminution de la production des ERO par les cellules après carence en fer.

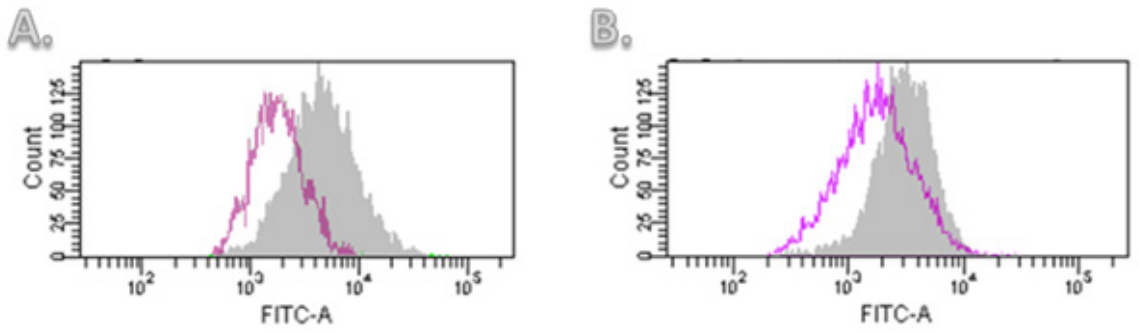


Figure 21: Mesure des espèces réactives de l'oxygène par la carboxy-H2DCF-DA en cytométrie de flux. *A: lignée KG1 et B: lignée K562. Le pic gris correspond à la fluorescence des cellules dans un état prolifératif et le pic violet à celle des cellules carencées.*

La mesure de la peroxydation lipidique et du glutathion total sont les deux autres analyses réalisées afin de caractériser l'état d'oxydo-réduction des modèles cellulaires.

La première, correspondant à la détermination de l'oxydation des composés membranaires lipidiques, repose sur la réaction de dosage du malondialdéhyde produit. On mesure cette aldéhyde par l'intermédiaire d'un pigment absorbant a 532 nm qui est formé en milieu acide et à chaud par réaction du malondialdehyde et deux molécules d'acide thiobarbiturique. Nos résultats ne révèlent pas de variation de la production de malondialdéhyde et donc de la peroxydation lipidique après carence en fer (*Fig. 22A*). La seconde analyse correspond à l'exploration d'une réponse anti-oxydante cellulaire par l'intermédiaire du glutathion. La mesure repose sur la détermination de la concentration en GSH total par réduction de l'acide

5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoique. Les résultats obtenus révèlent une diminution moyenne de la concentration de glutathion total après carence en fer de 60% [47 - 65%] pour la lignée KG1. La variation de la concentration de glutathion total n'est pas significative pour K562 (*Fig. 22*). On note également une variation inter-lignée du glutathion total basal d'un facteur six.

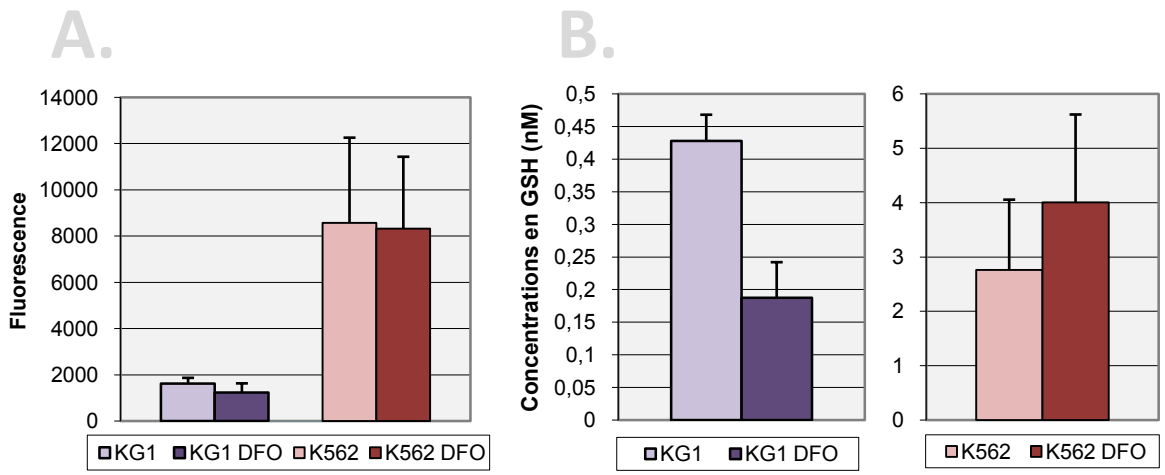


Figure 22: Mesure de la peroxydation lipidiques et du glutathion total avant et après carence en fer pour les deux modèles cellulaire. *A: Peroxydation lipidique (n=3) et B:Gluthathion total (GSH, n=2).*

2. DE L'EXPERIMENTAL A LA MODELISATION PUIS DE LA MODELISATION A L'EXPERIMENTATION

2.1 La modélisation du réseau fer

Les résultats présentés dans cette section ont été obtenus par N. Mobilia, E. Fanchon (TIMC-IMAG) et A. Donzé (VERIMAG et Berkeley University, USA).

2.1.1 Méthodologie

Depuis le début de ce projet, l'équipe Biologie Computationnelle et Mathématique (Laboratoire TIMC IMAG) s'efforce d'établir un modèle informatique du réseau fer (Fig. 13). Le premier fut établi exclusivement à partir de données publiées (112). Un second modèle plus perfectionné est en cours d'élaboration et comprend cette fois une partie des résultats expérimentaux obtenus ici (quantification protéique et quantification de transcrits).

Le réseau est décrit mathématiquement à l'aide d'équations différentielles décrivant le changement de concentration des espèces en fonction du temps, et se compose d'un terme de production, d'un terme de dégradation et d'un terme de régulation de l'espèce considérée (*Fig. 23*). Le terme de régulation comprend une fonction sigmoïde (Sig^{+}) qui est nulle si la variable x est inférieure au seuil Θ ou égale à 1 si la variable est supérieure à Θ.

$$\frac{dFPN1a}{dt} = \underbrace{k_{FPN1a_prod}}_{\text{Production basale}} - \underbrace{k_{IRP\to FPN1a} \times sig^{+}(IRP, \Theta_{IRP\to FPN1a})}_{\text{Régulation par l'IRP}} - \underbrace{k_{FPN1a_deg} \times FPN1a}_{\text{Dégradation spontanée}}$$

$$\frac{dIRP}{dt} = \overbrace{k_{IRP_prod}}^{\text{Production basale}} - \overbrace{k_{Fe\to IRP} \times sig^{+}(Fe, \Theta_{Fe\to IRP}) \times IRP}^{\text{Régulation de l'IRP par le fer}} - \overbrace{k_{IRP_deg} \times IRP}^{\text{Dégradation spontanée}}$$

Figure 23: Exemple de deux équations différentielles représentant l'évolution de la concentration en ferroportine et la concentration d'IRP dans le temps.

Le terme bleu correspond au terme de production de la protéine, le terme violet correspond au terme de dégradation et le terme central à la régulation avec un seuil Θ (rouge) du taux d'IRP régulant FPN1a (resp. du taux de fer régulant les IRP).

La résolution du système d'équations différentielles assignées au schéma de la figure 13 a produit un unique point stationnaire stable décrivant les cellules proliférantes (112).

Etant donné les nombreuses données manquantes dans la littérature, ainsi que l'utilisation de données n'ayant pas été établies dans le contexte biologique considéré ici (progéniteurs myéloïde), les valeurs pour chacun des différents paramètres du modèle ne sont pas toutes fixées précisément mais des contraintes leur sont imposées sous la forme d'inégalités en fonction du comportement observé du système. La stratégie de modélisation est d'utiliser des intervalles de valeurs pour chaque paramètre sous forme de contraintes. Ainsi, par exemple, connaissant le taux de production du récepteur de la transferrine, on pose l'hypothèse que le taux de production de FPN (pour lequel nous n'avons aucune donnée) n'est ni plus de 1000 fois supérieur à la valeur maximale du taux de production de TfR, ni 1000 fois inférieur à la valeur minimale. Soit un intervalle avec un différentiel de six ordres de grandeur. C'est cette utilisation de système par contraintes et d'inégalité qui constitue l'originalité de cette modélisation.

2.1.2 Exploration du système lors de la simulation d'une carence en fer

La dynamique du système a été étudiée à travers la simulation d'une carence martiale, correspondant à nos expérimentations avec chélation par deferoxamine. Pour cela un logiciel informatique, nommé *Breach (113)*, a été utilisé. Ce logiciel formalise le système étudié comme décrit dans le paragraphe précédent, et permet de simuler l'évolution dans le temps de ce système après une perturbations telle que la suppression de l'apport de fer. A partir de l'état d'équilibre défini dans des conditions suffisantes en fer (cellules proliférantes), la coupure de l'entrée de fer est introduite à T+6h par suppression de la transferrine. Un espace où les valeurs des différents paramètres satisfont les propriétés du système a ainsi été identifié. L'évolution du système avec trois des jeux de paramètres admissibles est représentée figure 24. Cette figure illustre le comportement attendu des cellules privées de fer, ce qui valide les solutions obtenues. Il est intéressant de constater que la concentration en ferroportine, l'exporteur de fer, décroit faiblement (moins de 10%) lors de la carence, alors que les autres variables, représentant les espèces considérées, varient fortement ou s'annulent.

La sensibilité des variables du modèle aux variations des différents paramètres a été calculée et permet d'identifier une hiérarchie parmi ces paramètres pour chaque variable. Par exemple, le seuil de la concentration de fer régulant les IRP ($\Theta_{Fe \rightarrow IRP}$) apparait comme l'un des paramètres principaux déterminant la disponibilité en fer, représentée par la variable [Fe] (*Fig. 25*). Ce résultat illustre l'un des intérêt de la modélisation qui, en l'occurrence, attire l'attention sur un paramètre d' intérêt biologique mais aussi clinique. En effet, il est l'élément déclenchant du système régulateur IRE-IRP, et il détermine en cela la capacité des cellules étudiées (ici les progéniteurs myéloïdes) à proliférer. Cet aspect fait sens pour le développement des blastes dans les LAM, ou lors des rechutes dans lesquels le clone leucémique reprend un avantage prolifératif sur les cellules saines, par exemple.

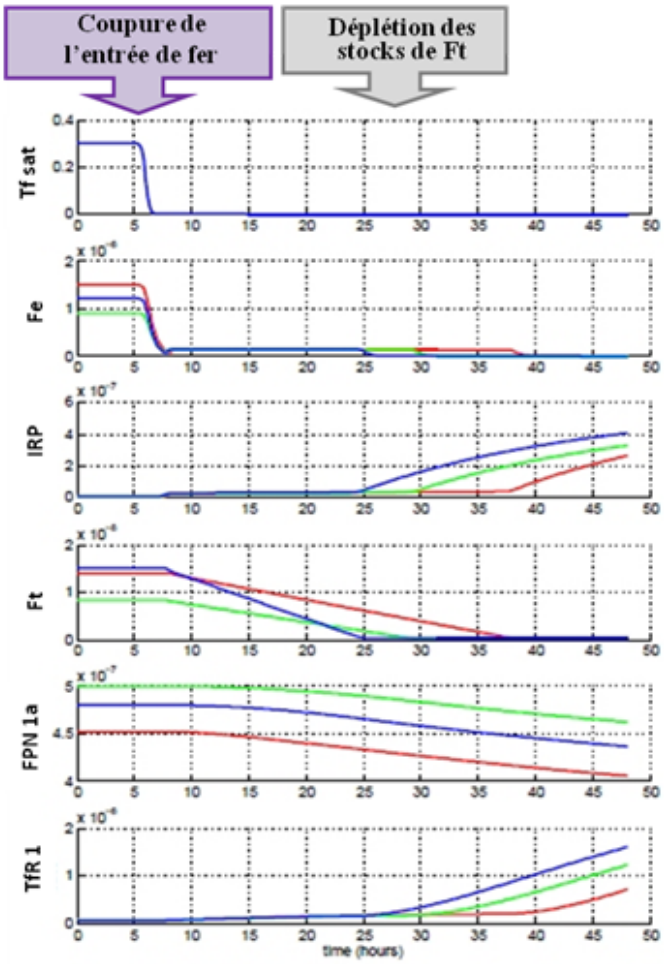


Figure 24: Simulation dynamique du comportement de chacune des espèces à travers le temps lorsque l'entrée de fer est coupée à T+6h. *D'après Mobilia et al, EPTCS 2012.*

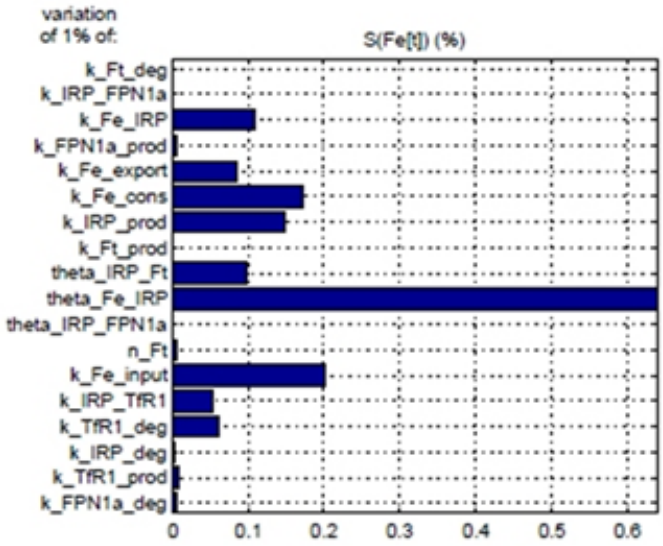


Figure 25: Sensibilité de la concentration en fer lors de la variation d'1% des différents paramètres du système. *D'après Mobilia et al, EPTCS 2012.*

2.2 Evaluation du seuil $\Theta_{Fe \rightarrow IRP}$

Le seuil de fer Θ régulant l'activité des IRP correspond à la concentration en fer suffisante pour les besoins cellulaires et qui inactive la fonction régulatrice des IRP sur les différentes cibles IRE. Cette inactivation permet la préservation des cellules vis à vis du fer intra-cellulaire (ex: synthèse accrue de ferritine) et évite l'entrée excessive de fer extra-cellulaire (déstabilisation du messager du récepteur de la transferrine). Ainsi, afin d'évaluer l'ordre de grandeur de ce seuil qui n'a jamais été estimé, les cellules ont été carencées par de la deferoxamine durant 24h ce qui supprime l'absorption de fer par les cellules et participe à l'épuisement des réserves en fer comme défini par les expérimentations précédentes. A partir de ce stade (après carence), les cellules ne prolifèrent plus et une partie d'entre elles entre en apoptose (*Fig. 15*). On soumet alors à un nombre de cellules défini, différentes concentrations de transferrine apportant une quantité de fer connue (Fe= 0, 1, 5, 25, 125 nM). Au bout de 24h supplémentaires sont mesurées la densité cellulaire pour juger de la reprise de la croissance, la concentration en fer intracellulaire totale pour suivre sa réincorporation, la quantité relative de ferritine, récepteur transferrine et IRP. L'état du cycle cellulaire et la quantification des différentes phases sont également évalués.

Après carence, les cultures sont ensemencées à 500 000 cellules/ml. Après 24h, en l'absence de fer et pour des concentrations faibles (1 et 5 nM), la densité cellulaire diminue pour K562 (*Fig. 26B*), reste stable pour KG1 (*Fig. 26A*). Puis pour des concentrations plus élevées (25,

125 nM), elle retrouve la valeur initiale pour K562 avec Fe=125nM (*Fig. 26B*) et augmente pour KG1 dès la condition Fe=5 nM (*Fig. 26A*). Ces évolutions de densité cellulaire correspondent à la somme de la mort cellulaire se poursuivant après carence et à la reprise de la prolifération due à l'apport de fer. Elles sont à mettre en parallèle avec les mesures de fer intra-cellulaire (*en violet sur la figure 26*). Cette concentration en fer évolue dans le même sens que la densité, à savoir une augmentation dès la condition Fe=5 nM pour KG1 et, pour K562, une augmentation progressive à compter de la condition Fe=25 nM. Comparant la concentration en fer intra-cellulaire avant et après carence, celle-ci s'avère être divisée par 3 pour KG1 et par 4 pour K562.

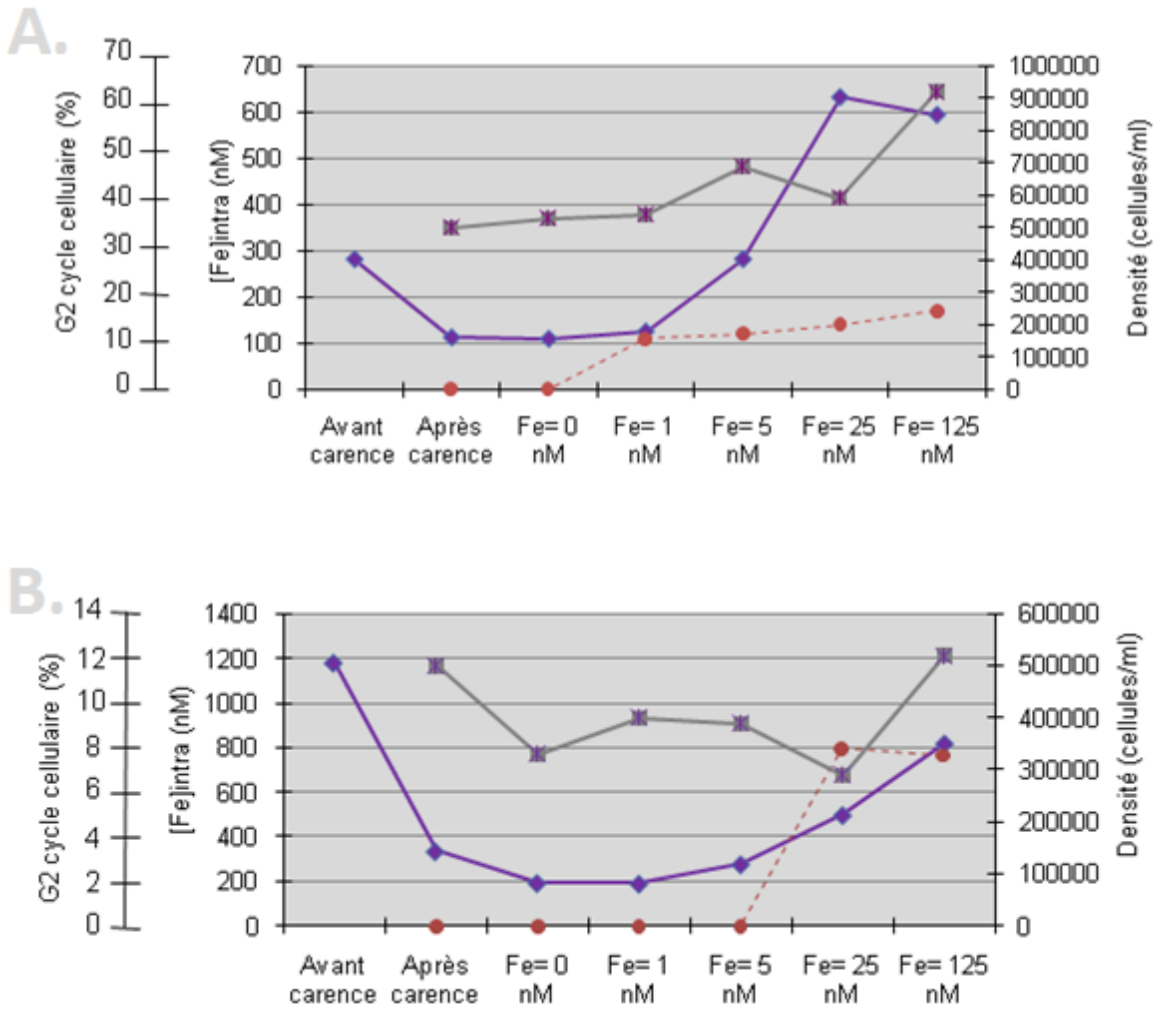


Figure 26: Evolution du pourcentage de cellules en phase G2, de la concentration intra-cellulaire en fer et de la densité après 24h de carence par deferoxamine 200µM, puis 24h de supplémentation en transferrine chargée selon différentes concentrations. *A: lignée KG1 et B: lignée K562. Courbe grise: densité cellulaire ; courbe violette: $[Fe]_{intra}$; et courbe rouge: % de cellule en G2.*

Si l'on regarde l'intégration des signaux d'identification protéique obtenus par western blot pour chaque concentration de transferrine apportée (*Fig. 27A et 27B*), on observe que la ferritine augmente surtout pour la condition Fe=125 nM pour KG1 (*Fig. 27C*). Pour K562, l'augmentation est progressive mais assez faible (*Fig. 27D*). Pour les deux lignées il y a une diminution progressive du récepteur de la transferrine (plus marquée pour KG1).

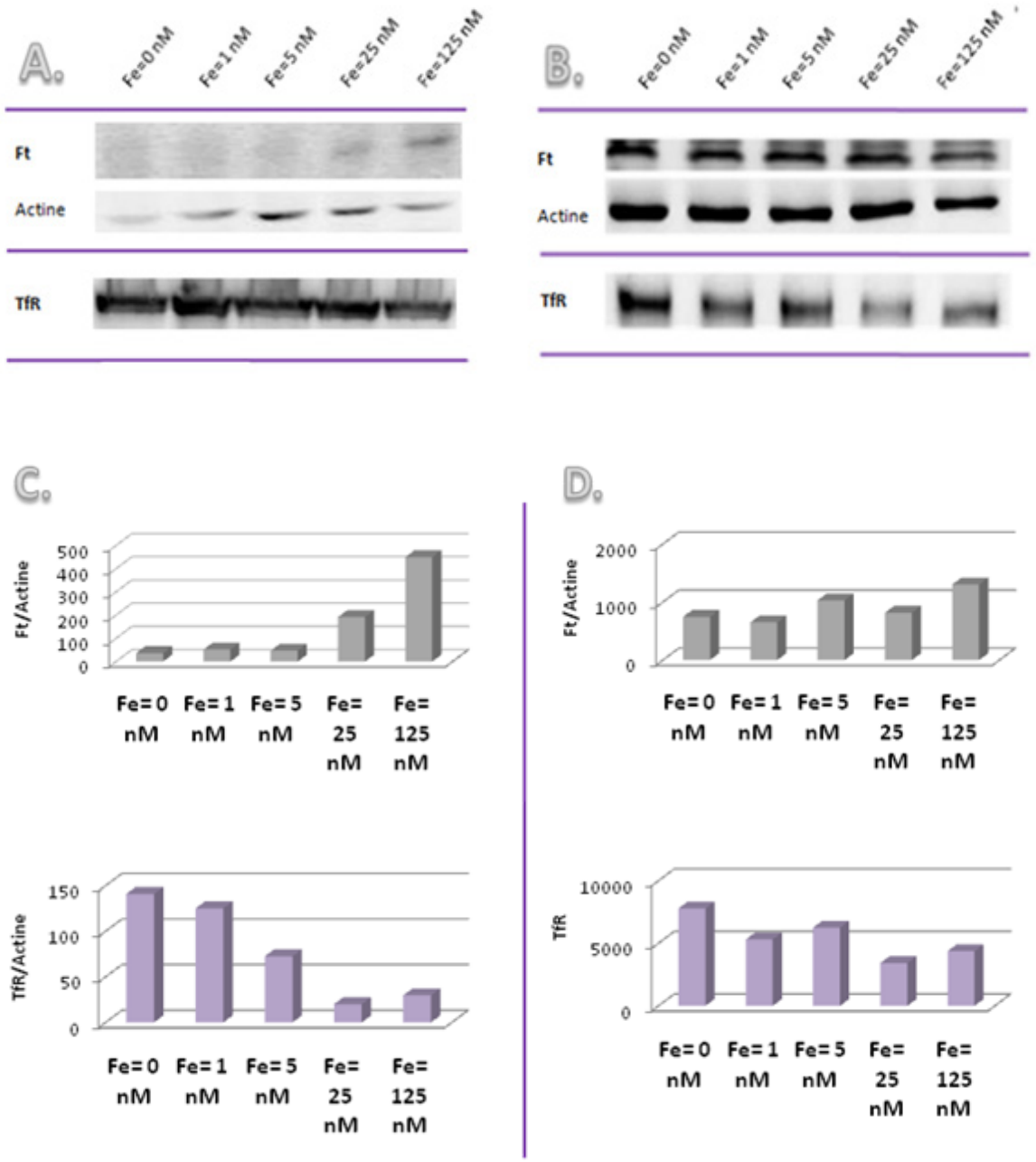
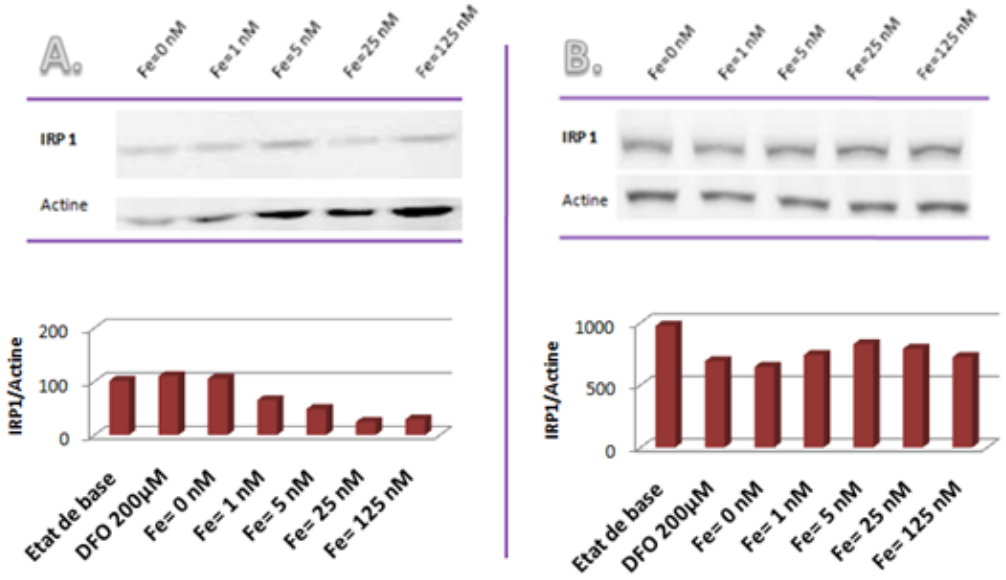


Figure 27: Identification protéique par western blot et évolution des concentrations de Ft et TfR1.
A: lignée KG1 et B: lignée K562. C et D: Intégration des bandes identifiées et normalisation par rapport à l'actine pour Ft.

Quant à la protéine IRP 1, les observations diffèrent. Pour KG1, on montre une diminution progressive de la protéine totale (forme IRP 1 active + forme aconitase) , alors que pour K562 la concentration est stable. Ceci est à mettre en regard avec la détermination de l'activité IRP totale (*Fig. 28*) réalisé sur une unique expérimentation. Dans le cas de KG1, l'activité reste maximale après carence (100%), diminue faiblement pour de faible quantité de fer, mais diminue très fortement pour 125nM de fer ajouté au milieu (28%). Ce taux d'IRP actif est alors 2,5 fois inférieur à l'état de base des cellules. Deux valeurs n'ont pu être déterminées pour KG1 (ND). Pour K562, partant d'un état de base avec un pourcentage d'IRP actif faible (28%), l'activité est forte (oscillant entre 70 et 100%) après carence et pour de faibles ajouts de fer. A 125nM de fer la moitié des IRP sont actifs, correspondant à un taux 1,7 fois supérieur à l'état de base des cellules. La diminution moins forte de l'activité IRP pour K562 par rapport à KG1 confirme les résultats obtenues figure 27 d'une croissance de la Ft et une décroissance de TfR1 moins marquées pour K562.



C.

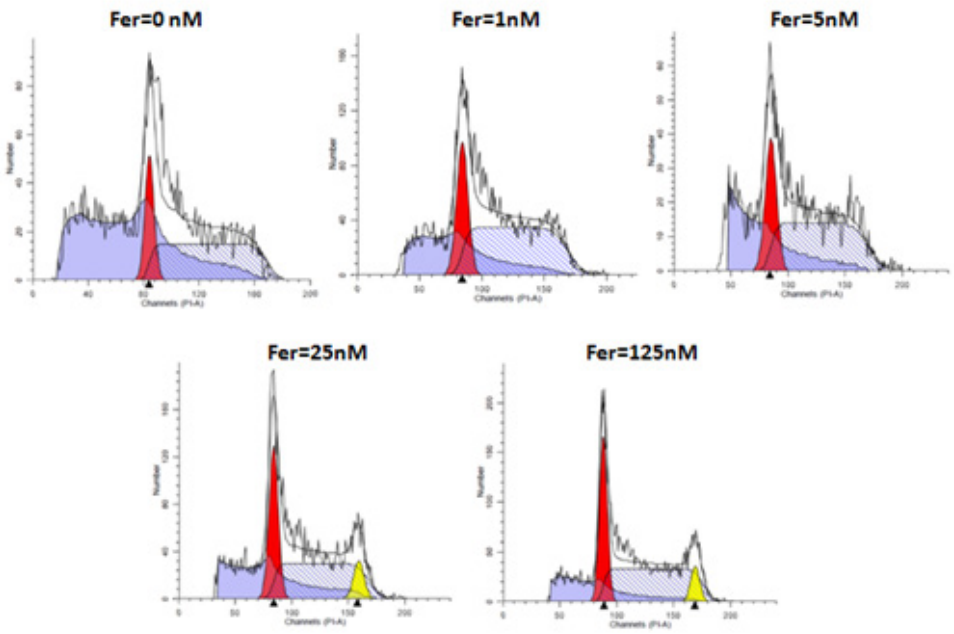
% IRP actif	Etat de base	DFO 200µM	Fe=0 nM	Fe=1 nM	Fe=5 nM	Fe=25 nM	Fe=125 nM
KG1	72	100	100	68	ND	ND	28
K562	28	81	67	100	73	100	47

Figure 28: : Identification protéique d'IRP 1 par western blot, évolution des sa concentration et détermination du pourcentage d'IRP (IRP 1 + IRP 2) actif.

A: lignée KG1; B: lignée K562; C: intégration des gels retards pour les lignées KG1 et K562 avant, après carence ferrique et après supplémentation en fer.

Enfin, en examinant le déroulement du cycle cellulaire, on peut déterminer à partir de quelle condition une reprise de la croissance cellulaire, reflet d'une concentration suffisante pour satisfaire la division, se produit. Ainsi, comme le montre l'exemple de la figure 29 et la courbe rouge de la figure 26, on confirme pour K562 l'absence de croissance pour les conditions Fe= 0, 1 et 5 nM avec une absence significative de phase G2/M sur le cycle. Puis à partir de Fe= 25 nM, on retrouve cette phase, témoignant d'une reprise de la prolifération. La reprise de la prolifération plus précoce pour KG1, à partir de Fe=1 à 5nM, a également été vérifiée (Fig.26).

L'ensemble de ces résultats nous permet d'estimer que le seuil Θ se situe entre 1 et 5nM d'apport de fer via la transferrine pour la lignée KG1 et entre 5 et 25nM pour K562.



K562	%G1	%S	%G2
Fer=0 nM	25,17	74,83	0,00
Fer=1 nM	27,13	72,27	0,00
Fer=5 nM	29,03	70,97	0,00
Fer=25 nM	31,78	60,22	8,00
Fer=125 nM	30,55	61,76	7,69

Figure 29: Exemple d'évolution du cycle cellulaire pour K562 selon les différentes conditions de supplémentation en fer. *En rouge la déconvolution de G0/G1, en jaune celle de G2/M et entre les deux (partie hachurée) la phase S.*

Ces expériences ont été réalisées quatre fois pour chaque lignée. Dans une minorité de cas les cellules pour les conditions Fe=0 et Fe=1 nM ont continué de croître, en accord avec une concentration intra-cellulaire en fer suffisante, avec un niveau de ferritine assez élevé et un cycle caractéristique d'une croissance. Ces expériences n'ont pas été conservées, car elles traduisent un défaut de carence induite par le traitement.

Discussion

Comme en témoignent, par exemple, les travaux de *Callens et al.* sur l'induction de la différenciation lors de la privation des cellules leucémiques en fer *in vitro* et *in vivo* (essai sur un patient), un lien semble exister entre la régulation de l'utilisation cellulaire du fer, l'équilibre d'oxydoréduction et la balance prolifération/différenciation des cellules leucémiques. Néanmoins, les détails mécanistiques des interactions entre fer et ERO dans les LAM ne sont pas connus, ce qui empêche pour l'instant la rationalisation des approches thérapeutiques pouvant cibler les voies les plus pertinentes. Nous essayons donc par une double approche, expérimentale et de modélisation, d'évaluer ces réseaux complexes de régulation du fer et de l'équilibre redox dans les cellules leucémiques myéloïdes afin d'élucider les mécanismes permettant aux blastes de proliférer tout en échappant au processus de différenciation, et de définir ainsi les cibles thérapeutiques les plus adaptées. Nous nous sommes tout d'abord focalisés sur le réseau fer pour lequel nous avons caractérisé l'état de certains des acteurs majeurs dans deux modèles de lignées leucémiques, d'une part à l'état de base c'est à dire lors de la phase de prolifération des cellules, et d'autre part en état de carence en fer induisant un arrêt de croissance de ces cellules.

- ***Un système régulateur IRE-IRP actif, fonctionnel et sous la dépendance de la concentration en fer***

Nous avons identifié d'une part la présence de protéine IRP 1 chez les deux lignées avec une activité IRP globale importante pour KG1 (~72%) et plus modeste pour K562 (~28%), et d'autre part nous avons observé une régulation effective *in cellulo* des IRP endogènes actifs sur des ARNm exogènes portant un IRE en 5' de la séquence codante et capables de révéler la répression exercée par les IRP. Pour les lignées cellulaires étudiées, une augmentation de la concentration d'IRE ne perturbe pas l'efficacité de régulation par les IRP sur les IRE (§1.1.2 p76). Nos mesures *in cellulo* ne révèlent donc pas de redistribution des IRP vers des cibles IRE privilégiées comme pouvait le suggérer les résultats de *Goforth et al.*, dont les auteurs démontrèrent *in vitro* une gamme de constantes de dissociation IRP 1-IRE balayant un ordre de grandeur sur les IRE en 5' et donc une différence potentielle significative du contrôle de la traduction des ARNm (114). L'influence du type cellulaire et l'état cellulaire (bénin ou malin) doit donc être considéré sur la base de ces résultats, car d'une part il a été démontré une

activité régulatrice plus importante pour FTH que ACO2 dans les cellules hépatiques normales (68). Et d'autre part, il a été mis en évidence l'existence de modifications de la régulation post-transcriptionnelle standard avec une traduction de l'ARNm FTH/FTL moins sensible à l'activation par le fer que la traduction de l'ARNm de ALAS2 dans les étapes terminales de la différenciation des progéniteurs érythroïdes murins (95). Notre résultat suggérant l'absence de spécificité de l'interaction entre IRP endogènes (donc à la fois IRP 1 et IRP 2 en proportions variables suivant les conditions) et les divers IRE, nécessite confirmation et une interprétation plus poussée dans le contexte biologique étudié. Ainsi nous avons débuté une analyse des transcrits luciférase et de l'ensemble des transcrits décrits dans ce travail pour les cellules transfectées par un ARNm exogène porteur d'un IRE. Les premiers résultats pour KG1 (non présentés), bien que nécessitant confirmation, montrent l'absence de perturbation de la transcription des cibles du système IRE-IRP, ainsi que l'absence de déplacement des IRP (en se fiant à l'absence de variation des transcrits TfR1) en introduisant une quantité d'ARNm IRE[+] (ou IRE[-]) au moins équivalente à celle des transcrits du gène de référence. Ceci est un exemple des expérimentations complémentaires à réaliser. Ne sachant pas si ces observations sont caractéristiques des cellules leucémiques, une comparaison avec des cellules hématopoïétiques saines et d'autres types cellulaires semble indispensable. Nous avons également constaté la présence d'un certain nombre des cibles (ARNm) du système IRE-IRP dans les deux modèles cellulaires, cibles qui présentent de larges différences de concentrations au sein d'une même lignée (*Fig. 14*). La plupart des composants du système IRE-IRP sont donc présents et l'absence de différence de régulation des IRP entre les différents IRE ajoutés suggère que les IRP actifs se distribuent selon la concentration relative de chaque ARNm déterminée lors de nos expérimentations. Même si les messagers des IRP sont en quantités relativement faibles, nos mesures préliminaires de protéines (données non présentées) donnent entre 60 000 à 15.10^6 IRP 1 par cellule, soit une quantité suffisante pour interagir stoechiométriquement avec les messagers mesurés, estimés entre 50 000 et 250 000 par cellule grâce à la référence interne (ADNc de la luciférase) introduite. A noter toutefois que toutes cibles des IRP n'ont pas été quantifiées dans notre travail et qu'à l'heure actuelle toutes les cibles de ce système n'ont probablement pas été identifiées.

En situation de carence en fer par le traitement deferoxamine, l'activation et le fonctionnement du système IRE-IRP sont confirmés. En effet, lors de la privation des cellules en fer on observe d'une part toujours une régulation par les IRP endogènes effective sur les IRE en 5' *in*

cellulo (§1.1.2 p76), et d'autre part une activité IRP globale fortement augmentée (*Fig.19*). Celle-ci, maximale pour KG1 et proche du maximum pour K562, démontre qu'IRP 1 est converti majoritairement sous forme active liant les IRE, sans que la concentration total de la protéine IRP 1 ne varie significativement. Les expérimentations de carence puis réintroduction de fer montrant une variation de l'activité IRP selon la concentration en fer ajoutée, associée aux variations des protéines d'intérêts correspondantes, vont également dans le sens d'un système régulateur présent et sous la dépendance de la concentration en fer (*Fig. 27, 28*). De plus, même si elle est faible, l'augmentation du taux de transcrit TfR1 après carence peut refléter l'effet des IRP, ce qui se traduit surtout au niveau protéique par une concentration 3 à 4 fois supérieure du récepteur de la transferrine. De même, l'observation de variations des concentrations protéiques comme la diminution de moitié de la ferritine est le signe attendu de l'activité répressive des IRP sur cette cible.

Ces données démontrent que le système IRE-IRP est actif au sein de ces modèles leucémiques, qu'il est fonctionnel, et sous la dépendance de la concentration en fer.

- ***Un besoin en fer différent entre lignées qui traduit un destin cellulaire différent***

A l'échelle moléculaire, les profils transcriptionnels des nœuds du réseau fer sont similaires entre les deux lignées étudiées lors de leur phase de prolifération. Les différences observées portent sur les transcrits ALAS2 et FPN1a présents uniquement chez K562 avec d'autres transcrits comme EpoR et les globines α/β/γ démontrant un engagement précoce de K562 vers la lignée érythroïde. Ceci est à mettre en relation avec un taux de transcrit des sous-unités ferritine et de récepteur de la transferrine supérieur chez K562 (*Fig.14C*), suggérant un besoin plus important en fer que la lignée KG1. Il est toutefois surprenant d'observer que c'est K562 et non KG1 qui exprime les transcrits codant l'exporteur de fer (FPN1a). Nous n'avons cependant pas été en mesure de vérifier la présence ou l'absence de la protéine correspondante. Ce besoin accru de fer pour K562 est confirmé par notre quantification absolue de la ferritine par western blot à l'aide d'une gamme de protéine pure (données non présentées) avec un taux respectif pour KG1 et K562 compris entre 0.0015 à 0.15 pg/cellule pour KG1 et 0.008 à 0.55 pg/cellule pour K562, soit une capacité de stockage du fer 3 à 5 fois plus importante pour K562. Cette capacité de stockage reflète probablement des besoins supérieurs pour K562, à mettre en relation avec sa vitesse de doublement relativement courte et sa tendance vers l'engagement érythrocytaire avec les caractéristiques associées. En effet, la

lignée K562 est caractérisée par un état de pré-synthèse d'hémoglobine (fœtale majoritairement) par la présence des ARNm codant les globines sans synthèse marquée de la protéine excepté en cas d'utilisation d'un inducteur comme l'hémine (non pratiqué dans nos expériences), ou lors de culture sur le long terme pouvant provoquer une différenciation spontanée avec notamment des érythrocytes producteurs d'Hb F ou B (115). K562 doit donc avoir la capacité de moduler l'effet homéostatique des IRP. Une autre possibilité correspondrait à un système IRE-IRP fonctionnel mais dépassé en étant non modulé par la concentration en fer, comme démontré dans les érythroblastes murins en état de différenciation terminal. Cette situation qui va à l'encontre du fonctionnement standard du système IRE-IRP, et permet un afflux massif de fer, pourrait être bénéfique aux cellules leucémiques cherchant à maximiser leur apport en fer pour proliférer. Or, comme nous l'avons démontré précédemment le système IRE-IRP des K562 est parfaitement fonctionnel, sous la dépendance de la concentration en fer et avec une activité moins forte en phase de prolifération (Fig.19) que pour des progéniteurs plus immatures (exemple: KG1), ce que confirment les concentrations de Ft et TfR1 (*Fig.20*). A la différence des cellules KG1 où le système IRE-IRP est déjà fortement sollicité à l'état de base, le système IRE-IRP des cellules K562 présente un degré d'activité très partiel et dispose ainsi d'une forte marge d'augmentation de la capacité de régulation des IRE comme nous avons pu le constater lors d'une carence en fer. Or, comme nous avons pu l'observer, la densité et donc la prolifération évoluent en parallèle à la variation de la concentration intra-cellulaire en fer (*Fig.26*). Ces deux lignées, avec leur discret décalage de stade de maturation et d'engagement, montrent une gestion du flux de fer sensiblement affectée.

Ceci est à mettre en relation, d'une part, avec la capacité proliférative supérieure des K562 et, d'autre part, avec une sensibilité plus accrue des cellules K562 notamment à la carence. En effet, ces dernières présentent un nombre de cellules plus important en phase S du cycle cellulaire, un blocage du cycle cellulaire en phase G0/G1 plus facile à obtenir qu'avec les KG1 (§1.1.1 p73) et après carence une mortalité cellulaire plus forte ainsi qu'une diminution plus importante de la concentration intra-cellulaire totale en fer (réduit d'un facteur 3 pour KG1 et d'un facteur 4 pour K562). Ainsi, bien que pour les deux lignées une carence efficace soit caractérisée par une diminution de seulement la moitié de la ferritine, la forme de stockage du fer, dans la très large majorité des cas cette diminution est suffisante pour stopper la croissance des K562 et même induire une mort par apoptose pour une partie des cellules, alors que dans un cas sur deux pour KG1 cette diminution est insuffisante pour modifier leur

destin cellulaire (§1.1.1 p73). Cela confirme le rôle crucial du fer dans le destin cellulaire, notamment dans l'arrêt de la croissance des cellules initiatrices et une gestion du fer quelque peu différente entre les lignées avec une dépendance plus forte vis à vis du fer de K562, alors que KG1 est capable de croitre avec de moindre concentrations de fer ce qui suppose une utilisation maximale des ressources intra-cellulaire et donc une meilleur gestion du fer intra-cellulaire qui passe notamment par le système IRE-IRP. L'incapacité des cellules KG1 d'exporter le fer en raison de l'absence de détection de transcrits FPN1a est un argument supplémentaire en faveur d'une diminution du flux de fer et d'une régulation plus stricte de son entrée. La détermination de l'activité respective d'IRP 1 et IRP 2, la quantité et l'évolution des concentrations d'IRP 2 dans le système et la comparaison à l'état d'activation de cellules saines semblent indispensables pour déterminer s'il y a une hyperactivation du système IRE-IRP chez KG1 et si cela correspond à un système d'adaptation propre aux cellules leucémiques.

- ***Similitude d'une partie du système IRE-IRP des modèles avec les progéniteurs sains***

La comparaison des profils des ARNm de lignées proliférantes à celui de cellules CD34+ témoin, montre une similitude transcriptionnelle des messagers du système IRE-IRP étudiés. Ces données indiquent donc une distribution des cibles du système IRP très proche entre progéniteurs sains et leucémiques. *In vitro* des variations d'expression des transcrits IRP 1 et IRP 2 ont été observées lors de l'induction de la différenciation de progéniteurs hématopoïétiques, avec une expression permanente de l'ARNm d'IRP 2 et une perte d'expression de l'ARNm d'IRP 1 au cours des premières étapes de la différenciation myéloïde, mais pas dans la différenciation érythroïde où les deux IRP jouent un rôle (92, 95). On a donc une partie du système régulateur de base similaire mais dont on ne connait pas l'état d'activation. Malheureusement nous n'avions pas assez de matériel pour quantifier les protéines d'intérêt (IRP 1, Ft, TfR1) des progéniteurs sains comme nous l'avons fait sur les lignées, ni effectuer une mesure d'activité IRP. On peut cependant faire deux remarques lorsqu'on compare l'ensemble du profil transcriptionnel du donneur sain à ceux des deux lignées. Premièrement, les cellules CD34+ témoins semblent plus engagées vers la lignée érythrocytaire avec un rapprochement de la lignée K562 par la présence des transcrits des globines, du récepteur de l'EPO, d'ALAS2 et de la ferroportine. La méconnaissance du pourcentage de pureté de la séparation des CD34+ est un biais potentiel et cette observation suggère d'envisager une sélection plus drastique des CD34+ pour la suite du travail sur les

échantillons témoins ou patients afin d'éviter les CD34+ en cours d'engagement vers une lignée. Et deuxièmement, la différence d'expression d'HILPDA suggère l'absence d'activation du facteur de transcription HIF 1 et donc est un argument pour une situation moins hypoxique chez le témoin par rapport aux deux lignées. L'origine périphérique des CD34+ du témoin est un biais potentiel et est peut-être en rapport avec cette différence observée pour HILPDA.

- ***Absence de stress oxydant après carence en fer pour les deux modèles***

In vitro les effets de la carence en fer sur la production cellulaire d'espèces réactives de l'oxygène apparaît comme très variable dans les LAM, comme dans les MDS, car très dépendant des conditions d'exposition dont la durée. Dans les LAM, *Callens et al.*, observèrent *in vitro* sur d'autres lignées cellulaires, une augmentation des ERO dépendante de la concentration et du temps d'exposition de DFO (109). Il en fut de même dans les cellules CD34+ de MDS (108) exposées au deferasirox (DFX), alors que *in vivo* un essai clinique observa une diminution des ERO dans les globules rouges associé à une augmentation du glutathion des cellules périphériques après trois mois de traitement par DFX (107). Comme le suggèrent *Pullarkat et al.*, les effets des chélateurs du fer sur les changements redox diffèrent peut être *in vivo* de ce qui a été observé *in vitro* sur une exposition à court terme (108). Dans notre travail et en se fiant à quatre paramètres nous n'observons pas d'apparition de stress redox après carence pour les deux lignées. En effet, nous avons premièrement des transcrits de l'hème oxygénase 1 très faiblement représentés dans les deux lignées et non affectés par la carence. Or, HO-1 est induit par différents stress et participe aux défenses antioxydantes notamment par l'intermédiaire de l'un des produits ultimes de son activité de dégradation de l'hème, la bilirubine (116, 117). Deuxièmement, le gène HILPDA dont les transcrits ne montrent pas de variations après carence, est un marqueur de l'hypoxie sous la dépendance d'HIF 1α (118). Troisièmement, les mesures de peroxydation lipidique ne montrent pas de variations, avant et après carence, de l'oxydation des lipides. Et quatrièmement, la mesure des ERO par la carboxyH_2DCF-DA montre l'absence de production d'ERO après 24h de carence en fer, voire une légère diminution de ceux-ci. Ce dernier résultat est en accord avec les mesures à long terme du groupe de Callens, observant une augmentation transitoire des ERO pour une exposition à court terme au deferasirox (90 minutes) et au contraire une diminution après 16h d'exposition des lignées NB4 et OCI-AML3 (109).

Ces résultats sont à mettre en parallèle avec l'absence de variation du taux de glutathion total pour K562 (*Fig. 22*) et même sa diminution pour KG1 après carence en fer, avec une différence franche du taux basal de glutathion entre les deux lignées. Ceci confirme l'absence d'induction d'une situation pro-oxydante après 24h de traitement par chélateur dans les cellules viables, et montre également la différence de capacité entre les deux lignées à répondre à un éventuel stress oxydant dans un bref délais. A l'image de la différence supposée entre LAM et MDS vis à vis de la sensibilité au changement redox pouvant expliquer un effet sélectif sur la différenciation après carence, il est possible que les deux lignées ne soient pas sensibles de la même façon aux variations du fer disponible et n'y répondent pas de façon identique, notamment au niveau du système d'oxydoréduction, témoignant de la différence de leur nature.

- ***La modélisation une approche complémentaire***

Les multiples régulateurs et voies de régulation qui s'enchevêtrent et produisent des phénotypes parfois opposés pour une stimulation similaire constitue une complexité qu'il est difficile d'appréhender expérimentalement. C'est pour cela que nous pensons que la modélisation peut être un outil performant pour faire face à cette complexité validant et guidant la démarche expérimentale. Le premier modèle produit dans le cadre du présent projet (112) est certes très simplifié mais il a permis de démontrer que, premièrement, la modélisation d'un tel système est réalisable à partir des données disponibles, donnant un système robuste produisant de multiples trajectoires (évolution après perturbation en fonction du temps) valides et répondant aux contraintes soumises. Deuxièmement il présente un certain pouvoir prédictif en indiquant que la ferroportine reste élevée en situation de carence si elle ne subit que la régulation par les IRP. Un tel résultat alerte sur une anomalie potentiellement intéressante ou une limite du modèle, qui en l'occurrence n'a pas explicitement pris en compte la régulation de cet exporteur par l'hormone hepcidine. Et troisièmement, il nous a permis de mettre l'accent sur un paramètre critique au système qu'est le seuil de fer activant le système de régulation par les IRP et donc théoriquement le seuil de fer limite pour la prolifération cellulaire.

- ***La concentration en fer intra-cellulaire déterminante pour l'équilibre prolifération-quiescence: une donnée d'utilité certaine en pratique clinique***

Les arguments rassemblés dans ce travail montrent le lien qui existe entre disponibilité du fer et déroulement du cycle cellulaire sans que les concentrations de métal pertinentes n'aient été évaluées précédemment. Cette concentration en fer conditionne l'activité du système régulateur IRE-IRP dont les cibles participent à l'établissement des conditions nécessaires à la prolifération cellulaire ou à la différenciation, voire à la quiescence ou la mort. Ainsi, l'accumulation des données de mesure de densité, mesure de concentration intra-cellulaire en fer, d'activation des IRP, d'évolution du cycle cellulaire, sur les modèles cellulaires utilisés après carence et ré-apport de transferrine saturée converge vers un intervalle de concentration assez étroit conjuguant reprise de la croissance avec un déblocage en phase G0/G1 du cycle, augmentation du fer intra-cellulaire et diminution de l'activité du système régulateur IRE-IRP. Cet intervalle correspond au seuil de sensibilité au fer des protéines IRP, tel qu'introduit dans les équations utilisées pour la modélisation (Fig. 23). Bien que certaines mesures nécessitent d'être répétées, comme la mesure de l'activité IRP, nous estimons ce seuil entre 1 et 5nM d'apport de fer via la transferrine pour la lignée KG1, se retrouvant entre 10 et 30µM de fer intra-cellulaire total par cellule; et entre 5 et 25nM de fer via la transferrine pour la lignée K562, soit 12,5 et 21µM de fer intra-cellulaire total. Ces valeurs sont supérieures à celles attribuées au fer labile intra-cellulaire (*labile iron pool*), estimé autour de 1,5µM par *Epstzejn et al*, notamment pour K562 (119). Le concept de ce pool est supposé théoriquement n'être qu'une petite partie du fer total intra-cellulaire, et nos mesures de fer intra-cellulaire total révèlent à l'état de prolifération des concentrations de 28µM et 48µM pour KG1 et K562, respectivement. Nos mesures semblent donc en accord avec ce que l'équipe de Cabantchik a déterminé, dont la concentration en fer intracellulaire total des K562 de 35µM. A notre connaissance la concentration en fer total intra-cellulaire pour KG1 n'avait jamais été estimée et l'on constate que celle-ci est proche du seuil de fer nécessaire à la prolifération. On note également qu'en considérant la valeur de référence biologique de la concentration de transferrine plasmatique, établie à environ 3g/l soit 1.6g/l dans le sang total, on calcule une concentration théorique sanguine de transferrine de 20µM et une concentration théorique sanguine en fer total de 13µM, en tenant compte des 30% moyen de saturation de la transferrine. Cette concentration de l'ordre du micromolaire dans l'environnement cellulaire (au niveau périphérique et par extrapolation au niveau médullaire), comparée aux apports suffisants en fer via la transferrine de l'ordre du nanomolaire (mesurés dans ce travail),

confirme en condition physiologique l'excès de disponibilité du fer pour le développement des cellules leucémiques par rapport aux réels besoins cellulaires. Ceci suggère qu'il faudrait minimiser les apports en fer notamment après chimiothérapie ou greffe afin d'éviter de favoriser la prolifération des clones leucémiques résiduels, dans les limites d'une anémie tolérable pour le patient. De plus, comme décrit tout au long de ce travail, on retrouve une différence des besoins en fer entre les deux modèles cellulaires étudiés avec un seuil et une concentration initiale en fer plus importants pour K562 confirmant une dépendance vis à vis du fer plus forte.

La connaissance du niveau de fer suffisant aux besoins cellulaires présente un intérêt dans les pratiques cliniques. Ainsi, dans les cas de transfusions répétées, rencontrés par exemple dans les myélodysplasies, l'utilisation de cette estimation du seuil Θ pourrait permettre une meilleure adaptation du niveau de chélateur afin d'assurer un maintien de l'homéostasie du fer en minimisant les risques de stress cellulaire et d'évolution maligne. La pratique actuelle nécessite un suivi constant des doses de chélateurs qui peuvent, sur le long terme, causer des atteintes oculaires, auditives, rénales et hépatiques (120). C'est également le cas dans les LAM où le traitement par chélateur est envisagé. Dans de telles pathologies où l'on recherche un ré-engagement de la différenciation, il sera d'autant plus important d'avoir un bon ajustement de la dose de chélateur que, comme nous l'avons vu précédemment, cette différenciation est sensible au potentiel redox, qui dépend de la concentration et du temps d'exposition au chélateur (121). La meilleure approche du seuil de fer soutenant la prolifération cellulaire dans des conditions cliniques permettrait également d'estimer la supplémentation en fer adéquate à apporter aux patients souffrant d'anémie, d'insuffisance rénale ou toute autre pathologie marquée par une carence en fer. En effet à ce jour la quantité de fer apportée dans ces pathologies est basée sur des essais cliniques qui ne prennent en compte que, d'une part, le taux de fer plasmatique, qui correspond aux apports possibles aux cellules, et d'autre part, la ferritine plasmatique qui témoigne des réserves disponibles mais n'est pas exempte d'interférences. Ce sont ces deux paramètres qui sont utilisés pour le suivi et l'adaptation posologique car il faut éviter la toxicité qu'induirait une surcharge en fer. La prise en compte de la corrélation apport/comportement cellulaire, tel qu'abordé ici, pourrait permettre une meilleure adaptation du schéma posologique de la supplémentation en optimisant le but recherché (besoin physiologique) et en diminuant les effets potentiellement délétères.

La suite de notre travail consistera donc à déterminer l'image complète de ce système pour des cellules témoins et des cellules issues de patients atteints des différents types de LAM comme nous avons pu le faire pour les lignées. La principale difficulté d'un tel travail est d'obtenir une quantité de matériel biologique suffisant, nécessitant peut être une phase d'amplification des cellules primaires récoltées.

Conclusion

THESE SOUTENUE PAR: **POURCELOT Emmanuel**

TITRE:

ROLE DU FER ET DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE DANS LA PROLIFERATION ET LA DIFFERENCIATION DES LEUCEMIES AIGUËS MYELOBLASTIQUES

CARACTERISATION DU SYSTEME REGULATEUR IRE-IRP DANS L'HOMEOSTASIE DU FER DE DEUX LIGNEES LEUCEMIQUES HUMAINES

Le pronostic des leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) reste très péjoratif malgré les progrès de l'intensification thérapeutique. La survie moyenne à 5 ans est d'environ 40% pour les patients de moins de 60 ans et décroit rapidement avec l'âge. Parmi ces durées de survie moyenne il existe en fait des variations considérables de pronostic selon la nature de la LAM. La découverte d'un nombre croissant de gènes subissant des mutations somatiques a dessiné un nouveau paysage des LAM en une multitude de sous types reflétant mieux la complexité moléculaire de ces pathologies. La recherche de nouvelles thérapies ne peut donc s'affranchir d'une meilleure compréhension des mécanismes de leucémogénèse. Or, l'homéostasie du fer et l'équilibre d'oxydoréduction (redox) sont intimement associés au processus leucémique. Le blocage d'import cellulaire de fer ou la carence en fer peuvent induire, respectivement, la différenciation de lignées leucémiques ou de cellules tumorales de patients LAM vers le type monocytaire. La production excessive d'espèces réactives de l'oxygène a été décrite depuis longtemps dans les hémopathies malignes et en particulier dans les leucémies aiguës ou chroniques. Ainsi fer et potentiel redox conditionnent, entre autres, l'équilibre entre prolifération/renouvellement et différenciation des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques myéloïdes. Cependant, la relation exacte entre stress oxydant et potentiel tumoral reste encore méconnue.

Dans ce contexte, afin d'évaluer l'impact des réseaux de régulation du fer et de l'équilibre redox sur la prolifération et la différenciation des cellules leucémiques, nous avons déterminé l'état des médiateurs et des réseaux de régulation d'intérêt dans

deux modèles de lignées leucémiques humaines (KG1 et K562) avant et après une perturbation telle que la carence en fer. Notre démarche a été expérimentale, mais elle a nourri un effort de modélisation des processus impliqués et elle a bénéficié en retour des déductions faites à partir des modèles produits.

Nos observations des deux modèles leucémiques révèlent que le système régulateur du fer intra-cellulaire (système IRE-IRP) est actif, fonctionnel, et est sous la dépendance de la concentration en fer. Pour la première fois, les cibles de ce système ont été évaluées quantitativement, définissant un profil similaire entre les deux modèles de lignées leucémiques mais également très similaire au profil de cellules CD34+ issues d'un donneur sain. Nous avons par contre identifié une différence dans la gestion cellulaire du fer par les deux lignées impliquées dans la divergence de leur comportement cellulaire. Enfin, à partir des données expérimentales et en s'appuyant sur la modélisation, le seuil de fer nécessaire à la cellule leucémique pour proliférer, a été évalué et estimé. Ce seuil pourrait se révéler d'une importance considérable, premièrement dans l'ajustement de la posologie d'agents anti-leucémiques ciblant la prolifération des clones dérégulés, deuxièmement dans le traitement des patients leucémiques sous chimiothérapie et anémiés, et troisièmement avec les nombreux traitements dans lesquels un apport de fer au patient est nécessaire.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

GRENOBLE, LE 11/3/2013

LE DOYEN

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER * GRENOBLE * U.F.R. DE PHARMACIE

Professeur Christophe Ribuot

LE PRESIDENT DE LA THESE

C.H.U. de GRENOBLE
Pôle Biologiue
UM Hématologie Cellulaire
Pr MOSSUZ Pascal

Références

1. Pulte D, Redaniel MT, Jansen L, Brenner H, Jeffreys M. Recent trends in survival of adult patients with acute leukemia: overall improvements, but persistent and partly increasing disparity in survival of patients from minority groups. Haematologica. 2013;98(2):222-9. Epub 2012/08/30.
2. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature. 1994;367(6464):645-8. Epub 1994/02/17.
3. Chan WI, Huntly BJ. Leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. Seminars in oncology. 2008;35(4):326-35. Epub 2008/08/12.
4. Bacher U, Schnittger S, Haferlach T. Molecular genetics in acute myeloid leukemia. Curr Opin Oncol.22(6):646-55.
5. Marcucci G, Haferlach T, Dohner H. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. J Clin Oncol.29(5):475-86.
6. Gilliland DG, Jordan CT, Felix CA. The molecular basis of leukemia. Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program. 2004:80-97. Epub 2004/11/25.
7. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. Blood. 2001;97(8):2434-9. Epub 2001/04/06.
8. Zheng R, Levis M, Piloto O, Brown P, Baldwin BR, Gorin NC, et al. FLT3 ligand causes autocrine signaling in acute myeloid leukemia cells. Blood. 2004;103(1):267-74. Epub 2003/09/13.
9. Caligiuri MA, Briesewitz R, Yu J, Wang L, Wei M, Arnoczky KJ, et al. Novel c-CBL and CBL-b ubiquitin ligase mutations in human acute myeloid leukemia. Blood. 2007;110(3):1022-4. Epub 2007/05/04.
10. Rocnik JL, Okabe R, Yu JC, Lee BH, Giese N, Schenkein DP, et al. Roles of tyrosine 589 and 591 in STAT5 activation and transformation mediated by FLT3-ITD. Blood. 2006;108(4):1339-45. Epub 2006/04/22.
11. Lemmon MA, Pinchasi D, Zhou M, Lax I, Schlessinger J. Kit receptor dimerization is driven by bivalent binding of stem cell factor. The Journal of biological chemistry. 1997;272(10):6311-7. Epub 1997/03/07.
12. Schwartz S, Heinecke A, Zimmermann M, Creutzig U, Schoch C, Harbott J, et al. Expression of the C-kit receptor (CD117) is a feature of almost all subtypes of de novo acute myeloblastic leukemia (AML), including cytogenetically good-risk AML, and lacks prognostic significance. Leukemia & lymphoma. 1999;34(1-2):85-94. Epub 1999/06/01.
13. Lemmon MA, Ferguson KM. A new twist in the transmembrane signaling tool-kit. Cell. 2007;130(2):213-5. Epub 2007/07/31.
14. Kohl TM, Schnittger S, Ellwart JW, Hiddemann W, Spiekermann K. KIT exon 8 mutations associated with core-binding factor (CBF)-acute myeloid leukemia (AML) cause hyperactivation of the receptor in response to stem cell factor. Blood. 2005;105(8):3319-21. Epub 2004/12/25.
15. Ning ZQ, Li J, Arceci RJ. Signal transducer and activator of transcription 3 activation is required for Asp(816) mutant c-Kit-mediated cytokine-independent survival and proliferation in human leukemia cells. Blood. 2001;97(11):3559-67. Epub 2001/05/23.
16. Ning ZQ, Li J, McGuinness M, Arceci RJ. STAT3 activation is required for Asp(816) mutant c-Kit induced tumorigenicity. Oncogene. 2001;20(33):4528-36. Epub 2001/08/09.
17. Van Meter ME, Diaz-Flores E, Archard JA, Passegue E, Irish JM, Kotecha N, et al. K-RasG12D expression induces hyperproliferation and aberrant signaling in primary hematopoietic stem/progenitor cells. Blood. 2007;109(9):3945-52. Epub 2006/12/29.
18. Bacher U, Haferlach T, Schoch C, Kern W, Schnittger S. Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients. Blood. 2006;107(10):3847-53. Epub 2006/01/26.

19. Frohling S, Scholl C, Bansal D, Huntly BJ. HOX gene regulation in acute myeloid leukemia: CDX marks the spot? Cell cycle (Georgetown, Tex). 2007;6(18):2241-5. Epub 2007/09/21.
20. Dorrance AM, Liu S, Yuan W, Becknell B, Arnoczky KJ, Guimond M, et al. Mll partial tandem duplication induces aberrant Hox expression in vivo via specific epigenetic alterations. The Journal of clinical investigation. 2006;116(10):2707-16. Epub 2006/09/19.
21. Simon M, Grandage VL, Linch DC, Khwaja A. Constitutive activation of the Wnt/beta-catenin signalling pathway in acute myeloid leukaemia. Oncogene. 2005;24(14):2410-20. Epub 2005/03/01.
22. Rosenbauer F, Tenen DG. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. Nature reviews Immunology. 2007;7(2):105-17. Epub 2007/01/30.
23. Guzman ML, Neering SJ, Upchurch D, Grimes B, Howard DS, Rizzieri DA, et al. Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. Blood. 2001;98(8):2301-7. Epub 2001/10/06.
24. Guzman ML, Rossi RM, Karnischky L, Li X, Peterson DR, Howard DS, et al. The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. Blood. 2005;105(11):4163-9. Epub 2005/02/03.
25. Schlenk RF, Dohner K. Impact of new prognostic markers in treatment decisions in acute myeloid leukemia. Current opinion in hematology. 2009;16(2):98-104. Epub 2009/05/27.
26. Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, Mecucci C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. Blood. 2007;109(3):874-85. Epub 2006/09/30.
27. Baldus CD, Bullinger L. Gene expression with prognostic implications in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. Seminars in oncology. 2008;35(4):356-64. Epub 2008/08/12.
28. Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Mutations with loss of heterozygosity of p53 are common in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype, and a poor prognosis. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2001;19(5):1405-13. Epub 2001/03/07.
29. Plass C, Oakes C, Blum W, Marcucci G. Epigenetics in acute myeloid leukemia. Seminars in oncology. 2008;35(4):378-87. Epub 2008/08/12.
30. Costello JF, Plass C. Methylation matters. Journal of medical genetics. 2001;38(5):285-303. Epub 2001/05/23.
31. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. Cancer cell. 2010;18(6):553-67. Epub 2010/12/07.
32. Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, Fazi F, Fanelli M, Faretta M, et al. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. Science (New York, NY). 2002;295(5557):1079-82. Epub 2002/02/09.
33. Liu S, Shen T, Huynh L, Klisovic MI, Rush LJ, Ford JL, et al. Interplay of RUNX1/MTG8 and DNA methyltransferase 1 in acute myeloid leukemia. Cancer research. 2005;65(4):1277-84. Epub 2005/03/01.
34. Losman JA, Looper RE, Koivunen P, Lee S, Schneider RK, McMahon C, et al. (R)-2-hydroxyglutarate is sufficient to promote leukemogenesis and its effects are reversible. Science (New York, NY). 2013;339(6127):1621-5. Epub 2013/02/09.
35. Hole PS, Darley RL, Tonks A. Do reactive oxygen species play a role in myeloid leukemias? Blood. 2011;117(22):5816-26. Epub 2011/03/15.
36. Hole PS, Pearn L, Tonks AJ, James PE, Burnett AK, Darley RL, et al. Ras-induced reactive oxygen species promote growth factor-independent proliferation in human CD34+ hematopoietic progenitor cells. Blood. 2010;115(6):1238-46. Epub 2009/12/17.
37. Abdel-Wahab O, Levine RL. Metabolism and the leukemic stem cell. The Journal of experimental medicine. 2010;207(4):677-80. Epub 2010/04/07.

38. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. British journal of haematology. 1976;33(4):451-8. Epub 1976/08/01.
39. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. Annals of internal medicine. 1985;103(4):620-5. Epub 1985/10/01.
40. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 1999;17(12):3835-49. Epub 1999/11/30.
41. Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. Blood reviews. 2004;18(2):115-36. Epub 2004/03/11.
42. Mrozek K. Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype. Seminars in oncology. 2008;35(4):365-77. Epub 2008/08/12.
43. Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. The New England journal of medicine. 2012;366(12):1079-89. Epub 2012/03/16.
44. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, Buchner T, Willman CL, Estey EH, et al. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2003;21(24):4642-9. Epub 2003/12/16.
45. Berman E, Heller G, Santorsa J, McKenzie S, Gee T, Kempin S, et al. Results of a randomized trial comparing idarubicin and cytosine arabinoside with daunorubicin and cytosine arabinoside in adult patients with newly diagnosed acute myelogenous leukemia. Blood. 1991;77(8):1666-74. Epub 1991/04/15.
46. Wiernik PH, Banks PL, Case DC, Jr., Arlin ZA, Periman PO, Todd MB, et al. Cytarabine plus idarubicin or daunorubicin as induction and consolidation therapy for previously untreated adult patients with acute myeloid leukemia. Blood. 1992;79(2):313-9. Epub 1992/01/25.
47. Sanz MA, Lo-Coco F. Modern approaches to treating acute promyelocytic leukemia. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2011;29(5):495-503. Epub 2011/01/12.
48. Ferrara F. Treatment of unfit patients with acute myeloid leukemia: a still open clinical challenge. Clinical lymphoma, myeloma & leukemia. 2011;11(1):10-6. Epub 2011/04/02.
49. Smith M, Barnett M, Bassan R, Gatta G, Tondini C, Kern W. Adult acute myeloid leukaemia. Critical reviews in oncology/hematology. 2004;50(3):197-222. Epub 2004/06/09.
50. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. Blood. 1998;92(7):2322-33. Epub 1998/09/25.
51. Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schakel U, Platzbecker U, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. Blood. 2002;99(12):4326-35. Epub 2002/05/31.
52. Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. Blood. 2008;111(5):2776-84. Epub 2007/10/25.
53. Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. Blood. 2005;106(12):3733-9. Epub 2005/08/04.

54. Thiede C, Koch S, Creutzig E, Steudel C, Illmer T, Schaich M, et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). Blood. 2006;107(10):4011-20. Epub 2006/02/04.
55. Schlenk RF, Dohner K, Krauter J, Frohling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. The New England journal of medicine. 2008;358(18):1909-18. Epub 2008/05/03.
56. Mrozek K, Radmacher MD, Bloomfield CD, Marcucci G. Molecular signatures in acute myeloid leukemia. Current opinion in hematology. 2009;16(2):64-9. Epub 2009/05/27.
57. Zhou FL, Zhang WG, Wei YC, Meng S, Bai GG, Wang BY, et al. Involvement of oxidative stress in the relapse of acute myeloid leukemia. The Journal of biological chemistry. 2010;285(20):15010-5. Epub 2010/03/18.
58. Zhang F, Wang W, Tsuji Y, Torti SV, Torti FM. Post-transcriptional modulation of iron homeostasis during p53-dependent growth arrest. The Journal of biological chemistry. 2008;283(49):33911-8. Epub 2008/09/30.
59. Yu Y, Kovacevic Z, Richardson DR. Tuning cell cycle regulation with an iron key. Cell cycle (Georgetown, Tex). 2007;6(16):1982-94. Epub 2007/08/28.
60. Wang J, Pantopoulos K. Regulation of cellular iron metabolism. The Biochemical journal. 2011;434(3):365-81. Epub 2011/02/26.
61. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. Biochemical Society transactions. 2007;35(Pt 5):1147-50. Epub 2007/10/25.
62. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Experimental physiology. 1997;82(2):291-5. Epub 1997/03/01.
63. Anderson GJ, Frazer DM, McLaren GD. Iron absorption and metabolism. Current opinion in gastroenterology. 2009;25(2):129-35. Epub 2009/06/17.
64. Breuer W, Shvartsman M, Cabantchik ZI. Intracellular labile iron. The international journal of biochemistry & cell biology. 2008;40(3):350-4. Epub 2007/04/25.
65. Hower V, Mendes P, Torti FM, Laubenbacher R, Akman S, Shulaev V, et al. A general map of iron metabolism and tissue-specific subnetworks. Molecular bioSystems. 2009;5(5):422-43. Epub 2009/04/22.
66. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. Science (New York, NY). 2004;306(5704):2090-3. Epub 2004/10/30.
67. Nemeth E, Ganz T. Regulation of iron metabolism by hepcidin. Annual review of nutrition. 2006;26:323-42. Epub 2006/07/20.
68. Wallander ML, Leibold EA, Eisenstein RS. Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. Biochimica et biophysica acta. 2006;1763(7):668-89. Epub 2006/07/29.
69. Sanchez M, Galy B, Dandekar T, Bengert P, Vainshtein Y, Stolte J, et al. Iron regulation and the cell cycle: identification of an iron-responsive element in the 3'-untranslated region of human cell division cycle 14A mRNA by a refined microarray-based screening strategy. The Journal of biological chemistry. 2006;281(32):22865-74. Epub 2006/06/09.
70. Dupuy J, Volbeda A, Carpentier P, Darnault C, Moulis JM, Fontecilla-Camps JC. Crystal structure of human iron regulatory protein 1 as cytosolic aconitase. Structure (London, England : 1993). 2006;14(1):129-39. Epub 2006/01/13.
71. Guo B, Phillips JD, Yu Y, Leibold EA. Iron regulates the intracellular degradation of iron regulatory protein 2 by the proteasome. The Journal of biological chemistry. 1995;270(37):21645-51. Epub 1995/09/15.
72. Vashisht AA, Zumbrennen KB, Huang X, Powers DN, Durazo A, Sun D, et al. Control of iron homeostasis by an iron-regulated ubiquitin ligase. Science (New York, NY). 2009;326(5953):718-21. Epub 2009/09/19.
73. Salahudeen AA, Thompson JW, Ruiz JC, Ma HW, Kinch LN, Li Q, et al. An E3 ligase possessing an iron-responsive hemerythrin domain is a regulator of iron homeostasis. Science (New York, NY). 2009;326(5953):722-6. Epub 2009/09/19.

74. Zumbrennen KB, Wallander ML, Romney SJ, Leibold EA. Cysteine oxidation regulates the RNA-binding activity of iron regulatory protein 2. Molecular and cellular biology. 2009;29(8):2219-29. Epub 2009/02/19.
75. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. Science (New York, NY). 2001;292(5516):464-8. Epub 2001/04/09.
76. Meyron-Holtz EG, Ghosh MC, Rouault TA. Mammalian tissue oxygen levels modulate iron-regulatory protein activities in vivo. Science (New York, NY). 2004;306(5704):2087-90. Epub 2004/12/18.
77. Schneider BD, Leibold EA. Effects of iron regulatory protein regulation on iron homeostasis during hypoxia. Blood. 2003;102(9):3404-11. Epub 2003/07/12.
78. Hanson ES, Foot LM, Leibold EA. Hypoxia post-translationally activates iron-regulatory protein 2. The Journal of biological chemistry. 1999;274(8):5047-52. Epub 1999/02/13.
79. Recalcati S, Minotti G, Cairo G. Iron regulatory proteins: from molecular mechanisms to drug development. Antioxidants & redox signaling. 2010;13(10):1593-616. Epub 2010/03/11.
80. Pantopoulos K, Hentze MW. Rapid responses to oxidative stress mediated by iron regulatory protein. The EMBO journal. 1995;14(12):2917-24. Epub 1995/06/15.
81. Soum E, Brazzolotto X, Goussias C, Bouton C, Moulis JM, Mattioli TA, et al. Peroxynitrite and nitric oxide differently target the iron-sulfur cluster and amino acid residues of human iron regulatory protein 1. Biochemistry. 2003;42(25):7648-54. Epub 2003/06/25.
82. Galy B, Ferring-Appel D, Kaden S, Grone HJ, Hentze MW. Iron regulatory proteins are essential for intestinal function and control key iron absorption molecules in the duodenum. Cell metabolism. 2008;7(1):79-85. Epub 2008/01/08.
83. Wang W, Di X, D'Agostino RB, Jr., Torti SV, Torti FM. Excess capacity of the iron regulatory protein system. The Journal of biological chemistry. 2007;282(34):24650-9. Epub 2007/07/03.
84. Galy B, Ferring D, Minana B, Bell O, Janser HG, Muckenthaler M, et al. Altered body iron distribution and microcytosis in mice deficient in iron regulatory protein 2 (IRP2). Blood. 2005;106(7):2580-9. Epub 2005/06/16.
85. Cooperman SS, Meyron-Holtz EG, Olivierre-Wilson H, Ghosh MC, McConnell JP, Rouault TA. Microcytic anemia, erythropoietic protoporphyria, and neurodegeneration in mice with targeted deletion of iron-regulatory protein 2. Blood. 2005;106(3):1084-91. Epub 2005/04/16.
86. Aguilar-Martinez P, Schved JF, Brissot P. The evaluation of hyperferritinemia: an updated strategy based on advances in detecting genetic abnormalities. The American journal of gastroenterology. 2005;100(5):1185-94. Epub 2005/04/22.
87. Cazzola M, Bergamaschi G, Tonon L, Arbustini E, Grasso M, Vercesi E, et al. Hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome: relationship between phenotypes and specific mutations in the iron-responsive element of ferritin light-chain mRNA. Blood. 1997;90(2):814-21. Epub 1997/07/15.
88. Liu W, Shimomura S, Imanishi H, Iwamoto Y, Ikeda N, Saito M, et al. Hemochromatosis with mutation of the ferroportin 1 (IREG1) gene. Internal medicine (Tokyo, Japan). 2005;44(4):285-9. Epub 2005/05/18.
89. Dycke C, Charbonnier P, Pantopoulos K, Moulis JM. A role for lysosomes in the turnover of human iron regulatory protein 2. The international journal of biochemistry & cell biology. 2008;40(12):2826-32. Epub 2008/06/28.
90. Maffettone C, Chen G, Drozdov I, Ouzounis C, Pantopoulos K. Tumorigenic properties of iron regulatory protein 2 (IRP2) mediated by its specific 73-amino acids insert. PloS one. 2010;5(4):e10163. Epub 2010/04/21.
91. Chen G, Fillebeen C, Wang J, Pantopoulos K. Overexpression of iron regulatory protein 1 suppresses growth of tumor xenografts. Carcinogenesis. 2007;28(4):785-91. Epub 2006/11/28.
92. Sposi NM, Cianetti L, Tritarelli E, Pelosi E, Militi S, Barberi T, et al. Mechanisms of differential transferrin receptor expression in normal hematopoiesis. European journal of biochemistry / FEBS. 2000;267(23):6762-74. Epub 2000/11/18.

93. Anderson SA, Nizzi CP, Chang YI, Deck KM, Schmidt PJ, Galy B, et al. The IRP1-HIF-2alpha axis coordinates iron and oxygen sensing with erythropoiesis and iron absorption. Cell metabolism. 2013;17(2):282-90. Epub 2013/02/12.
94. Cianetti L, Segnalini P, Calzolari A, Morsilli O, Felicetti F, Ramoni C, et al. Expression of alternative transcripts of ferroportin-1 during human erythroid differentiation. Haematologica. 2005;90(12):1595-606. Epub 2005/12/07.
95. Schranzhofer M, Schifrer M, Cabrera JA, Kopp S, Chiba P, Beug H, et al. Remodeling the regulation of iron metabolism during erythroid differentiation to ensure efficient heme biosynthesis. Blood. 2006;107(10):4159-67. Epub 2006/01/21.
96. Sanchez M, Galy B, Muckenthaler MU, Hentze MW. Iron-regulatory proteins limit hypoxia-inducible factor-2alpha expression in iron deficiency. Nature structural & molecular biology. 2007;14(5):420-6. Epub 2007/04/10.
97. Eliasson P, Jonsson JI. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. Journal of cellular physiology. 2010;222(1):17-22. Epub 2009/09/03.
98. Jang YY, Sharkis SJ. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. Blood. 2007;110(8):3056-63. Epub 2007/06/28.
99. Nurtjahja-Tjendraputra E, Fu D, Phang JM, Richardson DR. Iron chelation regulates cyclin D1 expression via the proteasome: a link to iron deficiency-mediated growth suppression. Blood. 2007;109(9):4045-54. Epub 2007/01/02.
100. Ohyashiki JH, Kobayashi C, Hamamura R, Okabe S, Tauchi T, Ohyashiki K. The oral iron chelator deferasirox represses signaling through the mTOR in myeloid leukemia cells by enhancing expression of REDD1. Cancer science. 2009;100(5):970-7. Epub 2009/03/21.
101. Tschan MP, Shan D, Laedrach J, Eyholzer M, Leibundgut EO, Baerlocher GM, et al. NDRG1/2 expression is inhibited in primary acute myeloid leukemia. Leukemia research. 2010;34(3):393-8. Epub 2009/09/25.
102. Pourcelot E, Mobilia N, Donzé A, Louis F, Maler O, Mossuz P, et al. Cellular iron regulation in animals: need and use of suitable models. (In review)2012.

103. Ito K, Hirao A, Arai F, Matsuoka S, Takubo K, Hamaguchi I, et al. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. Nature. 2004;431(7011):997-1002. Epub 2004/10/22.
104. Sallmyr A, Fan J, Datta K, Kim KT, Grosu D, Shapiro P, et al. Internal tandem duplication of FLT3 (FLT3/ITD) induces increased ROS production, DNA damage, and misrepair: implications for poor prognosis in AML. Blood. 2008;111(6):3173-82. Epub 2008/01/15.
105. Hartmann J, Braulke F, Sinzig U, Wulf G, Maas JH, Konietschke F, et al. Iron overload impairs proliferation of erythroid progenitors cells (BFU-E) from patients with myelodysplastic syndromes. Leukemia research. 2013;37(3):327-32. Epub 2012/12/25.
106. Taoka K, Kumano K, Nakamura F, Hosoi M, Goyama S, Imai Y, et al. The effect of iron overload and chelation on erythroid differentiation. International journal of hematology. 2012;95(2):149-59. Epub 2011/12/24.
107. Ghoti H, Fibach E, Merkel D, Perez-Avraham G, Grisariu S, Rachmilewitz EA. Changes in parameters of oxidative stress and free iron biomarkers during treatment with deferasirox in iron-overloaded patients with myelodysplastic syndromes. Haematologica. 2010;95(8):1433-4. Epub 2010/04/28.
108. Pullarkat V, Sehgal A, Li L, Meng Z, Lin A, Forman S, et al. Deferasirox exposure induces reactive oxygen species and reduces growth and viability of myelodysplastic hematopoietic progenitors. Leukemia research. 2012;36(8):966-73. Epub 2012/04/17.
109. Callens C, Coulon S, Naudin J, Radford-Weiss I, Boissel N, Raffoux E, et al. Targeting iron homeostasis induces cellular differentiation and synergizes with differentiating agents in acute myeloid leukemia. The Journal of experimental medicine. 2010;207(4):731-50. Epub 2010/04/07.

110. Roth M, Will B, Simkin G, Narayanagari S, Barreyro L, Bartholdy B, et al. Eltrombopag inhibits the proliferation of leukemia cells via reduction of intracellular iron and induction of differentiation. Blood. 2012;120(2):386-94. Epub 2012/05/26.
111. Paubelle E, Zylbersztejn F, Alkhaeir S, Suarez F, Callens C, Dussiot M, et al. Deferasirox and vitamin d improves overall survival in elderly patients with acute myeloid leukemia after demethylating agents failure. PloS one. 2013;8(6):e65998. Epub 2013/07/11.
112. Mobilia N, Donzé A, Moulis JM, Fanchon E. A Model of the Cellular Iron Homeostasis Network Using Semi-Formal Methods for Parameter Space Exploration. EPTCS. 2012;92:42-57.
113. Donze A, Fanchon E, Gattepaille LM, Maler O, Tracqui P. Robustness analysis and behavior discrimination in enzymatic reaction networks. PloS one. 2011;6(9):e24246. Epub 2011/10/08.
114. Goforth JB, Anderson SA, Nizzi CP, Eisenstein RS. Multiple determinants within iron-responsive elements dictate iron regulatory protein binding and regulatory hierarchy. RNA (New York, NY). 2010;16(1):154-69. Epub 2009/11/27.
115. Lozzio BB, Lozzio CB, Bamberger EG, Feliu AS. A multipotential leukemia cell line (K-562) of human origin. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY). 1981;166(4):546-50. Epub 1981/04/01.
116. Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M. Heme oxygenase and heme degradation. Biochemical and biophysical research communications. 2005;338(1):558-67. Epub 2005/08/24.
117. Haines DD, Lekli I, Teissier P, Bak I, Tosaki A. Role of haeme oxygenase-1 in resolution of oxidative stress-related pathologies: focus on cardiovascular, lung, neurological and kidney disorders. Acta physiologica (Oxford, England). 2012;204(4):487-501. Epub 2011/11/29.
118. Gimm T, Wiese M, Teschemacher B, Deggerich A, Schodel J, Knaup KX, et al. Hypoxia-inducible protein 2 is a novel lipid droplet protein and a specific target gene of hypoxia-inducible factor-1. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2010;24(11):4443-58. Epub 2010/07/14.
119. Epsztejn S, Kakhlon O, Glickstein H, Breuer W, Cabantchik I. Fluorescence analysis of the labile iron pool of mammalian cells. Analytical biochemistry. 1997;248(1):31-40. Epub 1997/05/15.
120. Chaudhary P, Pullarkat V. Deferasirox: appraisal of safety and efficacy in long-term therapy. Journal of blood medicine. 2013;4:101-10. Epub 2013/08/24.
121. Chaston TB, Watts RN, Yuan J, Richardson DR. Potent antitumor activity of novel iron chelators derived from di-2-pyridylketone isonicotinoyl hydrazone involves fenton-derived free radical generation. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2004;10(21):7365-74. Epub 2004/11/10.

Faculté de Pharmacie,
Université Joseph Fourier Grenoble I.

Serment de Galien

« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

ROLE DU FER ET DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE DANS LA PROLIFERATION ET LA DIFFERENCIATION DES LEUCEMIES AIGUËS MYELOBLASTIQUES

CARACTERISATION DU SYSTEME REGULATEUR IRE-IRP DANS L'HOMEOSTASIE DU FER DE DEUX LIGNEES LEUCEMIQUES HUMAINES

Le pronostic des leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) reste très péjoratif malgré les progrès de l'intensification thérapeutique. La découverte d'un nombre croissant de gènes subissant des mutations somatiques a dessiné un nouveau paysage des LAM en une multitude de sous types reflétant mieux la complexité moléculaire de ces pathologies. La recherche de nouvelles thérapies ne peut donc s'affranchir d'une meilleure compréhension des mécanismes de leucémogénèse. Or, l'homéostasie du fer et l'équilibre d'oxydoréduction (redox) sont intimement associés au processus leucémique. Le blocage d'import cellulaire de fer ou la carence en fer peuvent induire, respectivement, la différenciation de lignées leucémiques ou de cellules tumorales de patients LAM vers le type monocytaire. La production excessive d'espèces réactives de l'oxygène a été décrite depuis longtemps dans les hémopathies malignes et en particulier dans les leucémies aiguës ou chroniques. Ainsi fer et potentiel redox conditionnent, entre autres, l'équilibre entre prolifération/renouvellement et différenciation des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques myéloïdes. Cependant, la relation exacte entre stress oxydant et potentiel tumoral reste encore méconnue.

Dans ce contexte, afin d'évaluer l'impact des réseaux de régulation du fer et de l'équilibre redox sur la prolifération et la différenciation des cellules leucémiques, nous avons déterminé l'état des médiateurs et des réseaux de régulation d'intérêt dans deux modèles de lignées leucémiques humaines (KG1 et K562) avant et après une perturbation telle que la carence en fer. Notre démarche a été expérimentale, mais elle a nourri un effort de modélisation des processus impliqués et elle a bénéficié en retour des déductions faites à partir des modèles produits.

Nos observations des deux modèles leucémiques révèlent que le système IRE-IRP, système régulateur du fer intra-cellulaire, est actif, fonctionnel, et est sous la dépendance de la concentration en fer. Pour la première fois, les cibles de ce système ont été évaluées quantitativement, définissant un profil similaire entre les deux modèles de lignées leucémiques mais également très similaire au profil de cellules CD34+ issues d'un donneur sain. Nous avons par contre identifié une différence dans la gestion cellulaire du fer par les deux lignées impliquées dans la divergence de leur comportement cellulaire. Enfin, à partir des données expérimentales et en s'appuyant sur la modélisation, le seuil de fer nécessaire à la cellule leucémique pour proliférer, a été évalué et estimé. Ce seuil pourrait se révéler d'une importance considérable, premièrement dans l'ajustement de la posologie d'agents anti-leucémiques ciblant la prolifération des clones dérégulés, deuxièmement dans le traitement des patients leucémiques sous chimiothérapie et anémiés, et troisièmement avec les nombreux traitements dans lesquels un apport de fer au patient est nécessaire.

Mots clés: LAM, fer, IRE, IRP, prolifération, différenciation, lignée cellulaire, KG1, K562.

POURCELOT Emmanuel **21, chemin des sources** **pourcelot.emmanuel@wanadoo.fr**
38240 Meylan

Thèse soutenue à Grenoble le 04 octobre 2013