HAL
open science

La méthylation de l'ADN dans les leucémies aiguës myéloblastiques : impact de la chélation du fer et valeurs cliniques

Simon Chevalier

To cite this version:

Simon Chevalier. La méthylation de l'ADN dans les leucémies aiguës myéloblastiques : impact de la chélation du fer et valeurs cliniques. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-02302188

HAL Id: dumas-02302188

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02302188

Submitted on 1 Oct 2019

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.

UFR de Pharmacie
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

BIBLIOTHÈQUES UNIVERSITAIRES Grenoble Alpes

UNIVERSITÉ Grenoble Alpes
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 SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.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/juridique/droit-auteur
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

UFR DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2019

LA METHYLATION DE L'ADN DANS LES LEUCEMIES AIGUES MYELOBLASTIQUES : IMPACT DE LA CHELATION DU FER ET VALEURS CLINIQUES

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MEDICALE

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

THÈSE
PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
DIPLÔME D'ÉTAT

Simon CHEVALIER

[Données à caractère personnel]

MÉMOIRE SOUTENU PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Le : 20/09/2019

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury :

M. le professeur Pascal MOSSUZ (directeur de thèse)

Membres :

Mme la professeure Sophie PARK

Mme la docteure Christine LEFEBVRE

M. le professeur Patrice FAURE

M. le docteur Jean BRETON

L'UFR de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les mémoires ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

UFR de Pharmacie
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

Doyen de la Faculté : **M. le Pr. Michel SEVE**

Vice-doyen et Directrice des Etudes :
Mme Christine DEMEILLIERS

Année 2018 – 2019

ENSEIGNANTS – ENSEIGNANTS/CHERCHEURS
HDR et ou Pharmaciens

Statut	Nom	Prénom	Laboratoire	Pharmacien	HDR
MCF	ALDEBERT	DELPHINE	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525, TheREx	oui	oui
PU-PH	ALLENET	BENOIT	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525, ThEMAS	oui	oui
PU	BAKRI	ABDELAZIZ	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525	oui	oui
MAST	BARDET	JEAN-DIDIER	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525, ThEMAS	oui	non
MCF	BATANDIER	CECILE	LBFA – INSERM U1055	oui	non
PU-PH	BEDOUCH	PIERRICK	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525, ThEMAS	oui	oui
MCF	BELAIDI-CORSAT	ELISE	HP2, Inserm U1042	non	oui
MAST	BELLET	BEATRICE	-	oui	non
MCF	BOUCHERLE	BENJAMIN	DPM - UMR CNRS 5063	oui	non
PU	BOUMENDJEL	AHCENE	DPM – UMR CNRS 5063	non	oui
MCF	BOURGOIN	SANDRINE	IAB – CRI INSERM U823	non	non
MCF	BRETON	JEAN	LCIB – UMR CEA E3	oui	oui
MCF	BRIANCON-MARJOLLET	ANNE	HP2 – INSERM U1042	non	non
PU	BURMEISTER	WILHEM	UVHCI- UMI 3265 EMBL CNRS	non	oui
MCU-PH	BUSSER	BENOIT	Institute for Advanced Biosciences, UGA / Inserm U 1209 / CNRS 5309	oui	oui
Professeur Emerite	CALOP	JEAN	-	oui	oui
MCF	CAVAILLES	PIERRE	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525	non	non
MCU-PH	CHANOINE	SEBASTIEN	CR UGA - INSERM U1209 - CNRS 5309	oui	non
MCF	CHOISNARD	LUC	DPM – UMR CNRS 5063	non	non
AHU	CHOVELON	BENOIT	DPM – UMR CNRS 5063	oui	non
PU-PH	CORNET	MURIEL	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525 TheREx	non	oui
Professeur Emérite	DANEL	VINCENT		non	oui
PU	DECOUT	JEAN-LUC	DPM – UMR CNRS 5063	non	oui
MCF Emérite	DELETRAZ-DELPORTE	MARTINE	LPSS – EAM 4129 LYON	oui	oui
MCF	DEMEILLIERS	CHRISTINE	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525	non	oui
PU-PH	DROUET	CHRISTIAN	GREPI EA7408	oui	oui
PU	DROUET	EMMANUEL	IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale	oui	oui
MCF	DURMORT	CLAIRE	IBS – UMR CEA CNRS 5075	non	oui
PU-PH	FAURE	PATRICE	HP2 – INSERM U1042	non	oui

MCF	FAURE-JOYEUX	MARIE	HP2 – INSERM U1042	oui	oui
PRCE	FITE	ANDREE	-	non	non
MCU-PH	GARNAUD	CECILE	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525 TheReX	oui	non
PRAG	GAUCHARD	PIERRE-ALEXIS	-	non	non
MCU-PH	GERMI	RAPHAELE	IBS – UMR CEA CNRS 5075 HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale	oui	oui
MCF	GEZE	ANNABELLE	DPM – UMR CNRS 5063	non	oui
MCF	GILLY	CATHERINE	DPM – UMR CNRS 5063	oui	oui
PU	GODIN-RIBUOT	DIANE	HP2 – INSERM U1042	non	oui
MCF	GONINDARD	CHRISTELLE	LECA – UMR CNRS 5553	non	non
Professeure Emérite	GRILLOT	RENEE	-	oui	oui
MCF Emérite	GROSSET	CATHERINE	DPM – UMR CNRS 5063	oui	oui
MCF	GUIEU	VALERIE	DPM – UMR CNRS 5063	non	non
AHU	HENNEBIQUE	AURELIE	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525 TheREx	oui	non
MCF	HININGER-FAVIER	ISABELLE	LBFA – INSERM U1055	oui	oui
MCF	KHALEF	NAWEL	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525	non	non
MCF	KOTZKI	SYLVAIN	HP2 – UMR S1042	oui	non
MCF	KRIVOBOK	SERGE	DPM – UMR CNRS 5063	oui	oui
PU	LENORMAND	JEAN-LUC	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525 TheREx	non	oui
PU	MARTIN	DONALD	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525	non	oui
PRCE	MATTHYS	LAURENCE	-	non	non
AHU	MAZET	ROSELINE	DPM – UMR CNRS 5063	oui	non
AHU	MINOVES	MELANIE	HP2 – INSERM U1042	oui	non
PU	MOINARD	CHRISTOPHE	LBFA - INSERM U1055	non	oui
PU-PH	MOSSUZ	PASCAL	IAB – INSERM U1209	non	oui
MCF	MOUHAMADOU	BELLO	LECA – UMR CNRS 5553	non	oui
MCF	NICOLLE	EDWIGE	DPM – UMR CNRS 5063	oui	oui
MCF	OUKACINE	FARID	DPM – UMR CNRS 5063	non	non
MCF	PERES	BASILE	DPM – UMR CNRS 5063	non	oui
MCF	PEUCHMAUR	MARINE	DPM – UMR CNRS 5063	non	oui
PU	PEYRIN	ERIC	DPM – UMR CNRS 5063	oui	oui
AHU	PLUCHART	HELENE	TIMC-IMAG – UMR CNRS 5525 ThEMAS	oui	non
MCF	RACHIDI	WALID	LCIB – UMR E3 CEA	non	oui
MCF	RAVELET	CORINNE	DPM – UMR CNRS 5063	non	oui
PU	RIBUOT	CHRISTOPHE	HP2 – INSERM U1042	oui	oui
PU-PH	SEVE	MICHEL	LBFA – INSERM U1055	oui	oui
MCF	SOUARD	FLORENCE	DPM – UMR CNRS 5063	oui	non
MCF	SPANO	MONIQUE	IBS – UMR CEA CNRS 5075	non	oui
MCF	TARBOURIECH	NICOLAS	IBS – UMR CEA CNRS 5075	non	oui
MCF	VANHAVERBEKE	CECILE	DPM – UMR CNRS 5063	non	non
PU	WOUESSIDJEWE	DENIS	DPM – UMR CNRS 5063	oui	oui

AHU : Assistant Hospitalo-Universitaire
ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
BCI : Biologie du Cancer et de l'Infection
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie

CRI : Centre de Recherche INSERM
CNRS : Centre National de Recherche Scientifique
DCE : Doctorants Contractuels Enseignement
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institute for Advanced Biosciences
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
LPSS : Laboratoire Parcours Santé Systémique
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
MAST : Maitre de Conférences Associé à Temps Partiel
MCF : Maitre de Conférences des Universités
MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement
PU : Professeur des Universités
PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers
SyMMES : Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Energie et la Santé
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation
UMR: Unité Mixte de Recherche
UVHCI: Unit of Virus Host Cell Interactions

Remerciements

Aux membres du jury,

A Monsieur le professeur Pascal Mossuz pour avoir dirigé ce travail de thèse. Je vous remercie pour votre temps pour avoir su me transmettre une vision sans cesse positive des résultats durant ces travaux. Je vous remercie également pour la qualité de votre enseignement dont j'ai pu bénéficier au cours de mes études.

A Monsieur le docteur Jean Breton pour m'avoir permis d'intégrer l'équipe du CIBEST au CEA et m'avoir encadré durant l'année de master 2. Je vous remercie pour votre grande disponibilité et votre soutien aux cours de ces travaux.

A Madame la professeure Sophie Park, d'avoir pu vous libérer pour juger mon travail. Merci pour les nombreuses interactions clinico-biologiques au quotidien qui donnent son sens au métier de biologiste médicale.

A Madame le docteur Christine Lefebvre, pour avoir accepté de juger mon travail. Merci Christine pour ton enseignement de l'hématologie au quotidien, ta patience, ta bienveillance et ta disponibilité.

A Monsieur le professeur Patrice Faure, de me faire l'honneur de juger ce travail. Je vous remercie pour le temps et l'attention que vous m'avez accordé au cours de mes études, et particulièrement au cours de mon internat.

A mes amis

A mes chers co-internes, les « Z'internes givrés » : Clairoudoudou, Rézadoudou, Zélinoudoudou, VTH, Benj et JD pour tous ces moments d'amitiés passés ensemble. Laura « ma binôme », merci pour toutes ces années, Lucie pour tous ces moments d'échanges, Greg fervent défenseur de « la chèvre »… Merci également à Plazy (Ouiiiiii), Fan-fan, Ponpon, et tous les biololos. Merci à mes chers pharmaciens hospitaliers et aux internes d'hémato clinique pour avoir partagé tous ces moments de vie d'interne.

A mes amis de fac pharmaciens, ceux qui ont migré dans la région annecienne : Romain, Zu, Thomas et Jon pour tous ces matchs de foot endiablés. Adri « le grand », Lucas B2S, Lulu, Michou, Elo et les autres copains de promos.

Merci aux footeux du mardi soir, merci pour cette bouffée d'oxygène hebdomadaire.

A mes collègues

Au labo d'hémato, merci à l'équipe de cytologie : Claire, Gautier, Bénédicte et Pascal pour m'avoir enseigné l'hématocell ainsi qu'à toute l'équipe pour votre bienveillance au quotidien. Merci au labo de génétique : Christine, Sylvie, Clémentine et Sylvain pour m'avoir formé à cette discipline, merci aux techniciennes et aide-labo pour votre accueil, votre bonne humeur quotidienne.

Aux différentes personnes, biologistes, techniciens, secrétaires, aide-labo et ingénieurs avec qui j'ai pu travailler pendant mon internat, merci pour ces riches rencontres.

Merci à toute l'équipe du CIBEST pour m'avoir accueilli de manière si chaleureuse pour mes projets de recherche, merci à ceux avec qui j'ai particulièrement collaboré : Jean, Jean-Luc pour votre encadrement et Sylvain pour ton aide à la paillasse … et pour m'avoir permis de fêter 3 fois mon anniversaire l'an dernier.

Merci aux biologistes d'Annecy pour votre accueil, merci pour tout ce que vous m'avez appris pendant ce semestre d'une grande richesse.

A ma famille

Marion, ma boussole, mon étoile, merci pour ton affection et ton soutien inconditionnel.

A ma mère, mon père, Pascale et à mes grands-parents, merci pour votre soutien et votre dévouement.

A mes frangins, Capucine et Robin, merci pour votre complicité et tous les souvenirs d'enfance que l'on s'est créés.

A ma belle-famille, merci pour votre accueil et tous ces moments de partages.

Table des matières

Liste des figures 8
Liste des tableaux 9
Liste des abréviations 10
1. Introduction 11
2. Rappels bibliographiques 13
2.1 Leucémies aigües myéloblastiques 13
2.1.1 Définition et épidémiologie 13
2.1.2 Physiopathologie et leucémogénèse 14
2.1.3 Présentation clinique 19
2.1.4 Diagnostic et classifications internationales 20
2.1.5 Anomalies cytogénétiques et moléculaires et facteurs pronostiques 23
2.1.6 Prise en charge thérapeutique 26
2.1.7 Voies fonctionnelles en jeu 27
2.2 Mécanismes épigénétiques 29
2.2.1 Mécanismes de méthylation et différents dérivés de la cytosine 29
2.2.2 Modification des cytosines dans les leucémies aigües myéloblastiques . 32
2.3 Le fer 35
2.3.1 Métabolisme du fer chez l'Homme 35
2.3.2 Fer et LAM 36
2.2.3 Liens entre fer et méthylation des cytosines 37
3. Matériel et méthode 38
3.1. Privation en fer de lignées cellulaires 38
3.1.1 Lignées cellulaires 38
3.1.2 Protocole de chélation du fer 40
3.1.3 Evaluation du cycle cellulaire 42
3.2 Echantillons de patients atteints de LAM 44
3.2.1 Sélection des échantillons de patients 44
3.2.2 Caractéristiques génétiques et phénotypiques des échantillons patients 45
3.3 Quantification des dérivés de la cytosine par LC-MS/MS 49
3.3.1 Extraction et digestion de l'ADN 49
3.3.1 Quantification des dérivés de la cytosine 49
3.3.2 Validation de méthode 52
4. Résultats 54

4.1 Optimisation des conditions de culture et impact sur le cycle cellulaire de la chélation en fer 54
4.2 Quantification des dérivés de la cytosine 57
4.2.1 Taux de base dans les lignées cellulaires 57
4.2.3 Impact d'un agent hypométhylant sur les taux de dérivés de la cytosine dans les lignées cellulaires 59
4.2.3 Impact du fer sur les taux de dérivés de la cytosine dans les lignées cellulaires 60
4.2.3 Taux de dérivés de la cytosine chez les patients atteints de LAM 66
5. Discussion 72
6. Conclusion 81
Bibliographie 83

Liste des figures

Figure 1 : Prévalence des CHIP selon l'âge de l'individu

Figure 2 : Evolution de l'hématopoïèse clonale

Figure 3 : Paysage génomique dans les LAM

Figure 4 : Complexité des mutations dans les LAM

Figure 5 : Anomalies moléculaires et cooccurrence retrouvées dans les LAM

Figure 6 : Facteurs favorisants le développement d'une hématopoïèse clonale

Figure 7 : Classification cytologique FAB des LAM

Figure 8 : probabilité de survie selon le type d'anomalie génétique

Figure 9 : Formules chimiques de la 5mC et de la 5hmC

Figure 10 : Schéma représentant le cycle de méthylation et de déméthylation de l'ADN

Figure 11 : Schéma montrant les acteurs de la méthylation des cytosines lors de l'hématopoïèse normale et l'impact des différentes mutations dans les hémopathies myéloïdes

Figure 12 : Protocole de culture avec chélation du fer

Figure 13 : Exemple des résultats obtenus en CMF pour la lignée KG1.

Figure 14 : Mode de sélection des échantillons de patients

Figure 15 : Exemple de signal du spectromètre de masse

Figure 16 : Proportion de cellules en division dans les différentes conditions du protocole de chélation du fer

Figure 17 : Taux de 5mC et 5hmC des lignées cellulaires à l'état basal

Figure 18 : Taux de 5mC et 5hmC dans les lignées KG1 et OCI-AML3 avant et après traitement par l'azacitidine

Figure 19 : Taux de 5mC pour chacune des conditions du protocole de chélation du fer

Figure 20 : Taux de 5mC pour chacune des conditions du protocole de chélation du fer

Figure 21 : Taux de 5hmC pour chacune des conditions du protocole de chélation du fer

Figure 22 : Taux de 5hmC pour chacune des conditions du protocole de chélation du fer

Figure 23: Taux de 5mC et de 5hmC selon la classification FAB et selon l'OMS

Figure 24 : Taux de 5mC selon le statut mutationnel

Figure 25 : Taux de 5hmC selon le statut mutationnel

Figure 26 : Taux de 5mC et de 5hmC selon le groupe pronostic de l'ELN

Liste des tableaux

Tableau I : classification OMS 2016 des LAM

Tableau II : Stratification du risque selon le profil génétique selon l'ELN

Tableau III : Classifications, caractéristiques cytogénétiques, moléculaire et pronostiques des patients analysés

Tableau IV : Transitions utilisées pour chacun des analytes et standards internes

Tableau V : points de gamme utilisés pour chacun des analytes

Tableau VI : résultats de répétabilité et reproductibilité des dosages de 5mdCyd et 5hmdCyd

Tableau VII : Concentrations et temps d'incubation de la DFO et de la Tf ayant provoqué un blocage puis une relance du cycle cellulaire pour les différentes lignées

Tableau VIII : comparaison des taux de 5mC et de 5hmC avec la littérature.

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
ATRA : Acide tout-trans rétinoïque
BER : Réparation par excision de base
CBF : Core binding protein
CEBPA : CCAAT/enhancer-binding protein alpha
DFO : Déféroxamine
CEBPA : CCAAT-/enhancer binding protein alpha
CHIP : Hématopoïèse clonale de signification indéterminée
DMF : Cytométrie de flux
CSH : Cellule souche hématopoïétique
CV : Coefficient de variation
DNMT : DNA méthyltransférase
ELN : European Leukemia net
FAB : French American British
FAC : Citrate d'ammonium ferrique
Fe-Tf : Transferrine saturée en fer
FISH : Hybridation par fluorescence in-situ
FLT3 : Fms-like tyrosine kinase 3
IDH : Isocitrate DésHydrogénase
IP : Iodure de propidium
ITD : Duplication en tandem interne
LAM : Leucémie aigüe myéloblastique
LMMC : Leucémie myélomonocytaire
MLL : Mixed-lineage leukemia
NGS : Séquence de nouvelle génération
NPM1 : Nucléoplasmine 1
OMS : Organisation mondiale de la santé
SI : Standards internes
SMD : Syndrome myélodysplasique
TDG : Thymine DNA glycosylase
TET : Ten-Eleven Translocation
TfR1 : Récepteur à la transferrine 1
UPLC-MS/MS : chromatographie liquide ultra performante couplée à la spectrométrie de masse en tandem
WT1 : Wilm's Tumor 1
5CaC : 5-carboxylcytosine
5fC : 5-formylcytosine
dCyd : DésoxyCytidine
5hmC : 5hydroxyméthylcytosine
5hmdCyd : 5-hydroxyméthyl-2'-déoxyCytidine
5mC : 5-méthylcytosine
5mdCyd : -méthyl-2'-déoxyCytidine

1. Introduction

Les leucémies aigües myéloblastiques (LAM) sont des hémopathies malignes de mauvais pronostic dont les mécanismes oncogéniques ne sont pas encore bien élucidés. Le génotypage par séquençage de nouvelle génération (NGS) a permis une avancée majeure pour la améliorer la prise charge des patients sur le plan diagnostic, pronostic et théranostic.

De manière intéressante, les modifications de l'épigénome et notamment du méthylome ont un impact majeur sur les mécanismes de leucémogénèse, par exemple lorsque des mutations interviennent dans les gènes régulant la méthylation des cytosines tels que *DNMT3A*, *TET2* ou *IDH*. La 5-méthylcytosine (5mC) ainsi que les autres dérivés de la cytosine interviennent dans la régulation adaptative de l'expression des gènes, ce qui en fait un biomarqueur de réponse épigénétique aux variations environnementales, physiologiques ou pathologiques.

Ce document décrit l'étude que nous avons menée sur la méthylation de l'ADN dans les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM). L'étude de méthylation a été faite d'une part sur des échantillons médullaires de patients et d'autre part dans des lignées leucémiques modèles pour la recherche des liens entre fer et méthylation de l'ADN.

Un des objectifs de ce travail a été de déterminer l'impact de la privation en fer sur les dérivés méthylés de la cytosine. En effet, certaines enzymes de régulation de la 5mC et de la 5hmC sont fer dépendantes. D'autre part, les cellules leucémiques sur-expriment des récepteurs capables de capter le fer circulant, le fer étant un élément essentiel à la prolifération et à la survie cellulaire.

Ce travail avait également comme objectif de déterminer les taux de références de 5mC et de 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC) dans des cellules leucémiques de patients atteints de (LAM) et dans des lignées leucémiques. Nous avons comparé ces taux de dérivés méthylés au statut mutationnel des gènes impliqués dans la méthylation des cytosines.

Pour cela, nous avons mis au point le dosage de ces dérivés méthylés dans les prélèvements de patients et les lignées leucémiques, ainsi qu'un protocole de chélation du fer adapté à chacune des lignées leucémiques sélectionnées. Les résultats obtenus chez les patients ont été analysés en fonction de leurs caractéristiques clinico-biologiques, notamment les anomalies cytologiques, cytogénétiques, moléculaires et le pronostic des patients.

Ces travaux exploratoires contribuent à améliorer la compréhension de l'impact du méthylome dans la leucémogénèse et pourrait, à terme, faire émerger de nouveaux biomarqueurs d'utilité clinique.

2. Rappels bibliographiques

2.1 Leucémies aigües myéloblastiques

2.1.1 Définition et épidémiologie

Les leucémies aigües sont des hémopathies malignes se développant au niveau des cellules souches hématopoïétiques (CSH) ou progéniteurs hématopoïétiques, entrainant l'accumulation au sein de la moelle osseuse puis du sang de cellules leucémiques, appelées en cytologie « blastes ». Lorsque la cellule leucémique est issue de la lignée myéloïde, il s'agit de leucémie aigüe myéloblastique. Ces pathologies sont peu fréquentes et touchent environ 4 individus pour 100 000 habitants dans les pays occidentaux avec une incidence d'environ 2500 à 3000 nouveaux cas par an en France et représente 1.2% des nouveaux cas de cancers (1). Le pronostic de ces pathologies est péjoratif puisque seulement 28.3% des patients survivent 5 ans après le diagnostic. Cette distribution varie avec l'âge, 35 à 40% des patients âgés de 60 ans ou moins guérissent de la maladie alors que cette probabilité est seulement de 5 à 15% pour les patients âgés de plus de 60 ans (2). Ce faible taux de guérison chez les patients plus âgés peut être expliqué par l'impossibilité d'utiliser des chimiothérapies intensives, à cause des nombreux effets indésirables moins bien tolérés. Le diagnostic, à un stade probablement très tardif de la maladie (phase leucémique) et le manque de traitements spécifiques ciblant les cellules leucémiques expliquent très probablement ce pronostic global défavorable des LAM. Cela en fait un enjeu majeur pour la recherche médicale et pharmaceutique.

2.1.2 Physiopathologie et leucémogénèse

Lors de l'hématopoïèse normale, on observe une répartition pyramidale des éléments, au sommet de laquelle se trouvent les CSH, qui ont des propriétés d'autorenouvèlement et de différenciation. L'apparition de mutation dans une CSH génère un clone dont la compétitivité va être plus ou moins affectée. Selon l'agressivité (potentiel prolifératif) du clone hématopoïétique, l'équilibre du système peut ne pas être impacté et ne pas induire d'hémopathie.

Lorsque l'on identifie chez des individus sans maladie hématologique une ou plusieurs mutations somatiques dans les CSH, on parle alors de « CHIP » ou hématopoïèse clonale de signification indéterminée, même si les mutations détectées sont souvent des mutations récurrentes identifiées dans les hémopathies. La prévalence des CHIP évolue avec l'âge puisque seulement 0.3% des individus de moins de 40 ans présente une hématopoïèse clonale contre 10% après 70 ans et 20 % après 90 ans (3,4). (cf figure 1).

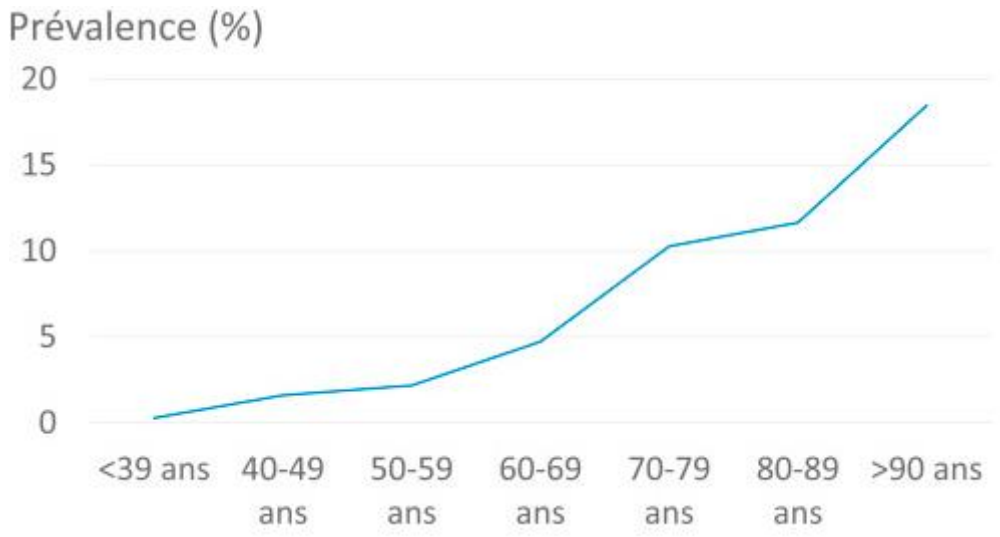


Figure 1 : Prévalence des CHIP selon l'âge de l'individu (3,4)

De manière intéressante, ces mutations concernent majoritairement des gènes impliqués dans la régulation du méthylome, puisqu'elles concernent *DNMT3A* dans 53% des cas et *TET2* dans 10% des cas (3,4). Pour pouvoir parler de CHIP, le seuil de proportion du variant doit être supérieur à 2%. Plus le seuil est élevé, plus le clone a un risque d'évoluer vers une hémopathie. Ce seuil est essentiel car un seuil trop bas n'est pas prédictif pour déterminer le risque d'évolution du clone.

Pour exemple, avec un seuil de 0.01%, environ 95% des individus de plus de 65 ans ont un clone présentant une mutation de *TET2*.

Lorsqu'une cytopénie apparaît sur la numération formule sanguine, le terme CHIP est exclu et est remplacé par le terme « ICUS » cytopénie idiopathique de signification indéterminée ou « UCUS » cytopénie clonale de signification indéterminée. Le clone peut ensuite évoluer vers un syndrome myélodysplasique (SMD) lorsque les critères cytologiques, génétiques et immunophénotypiques sont présents (figure 2) (4), Les SMD évoluant le plus souvent en LAM. On parle alors d'acutisation de la maladie hématologique.

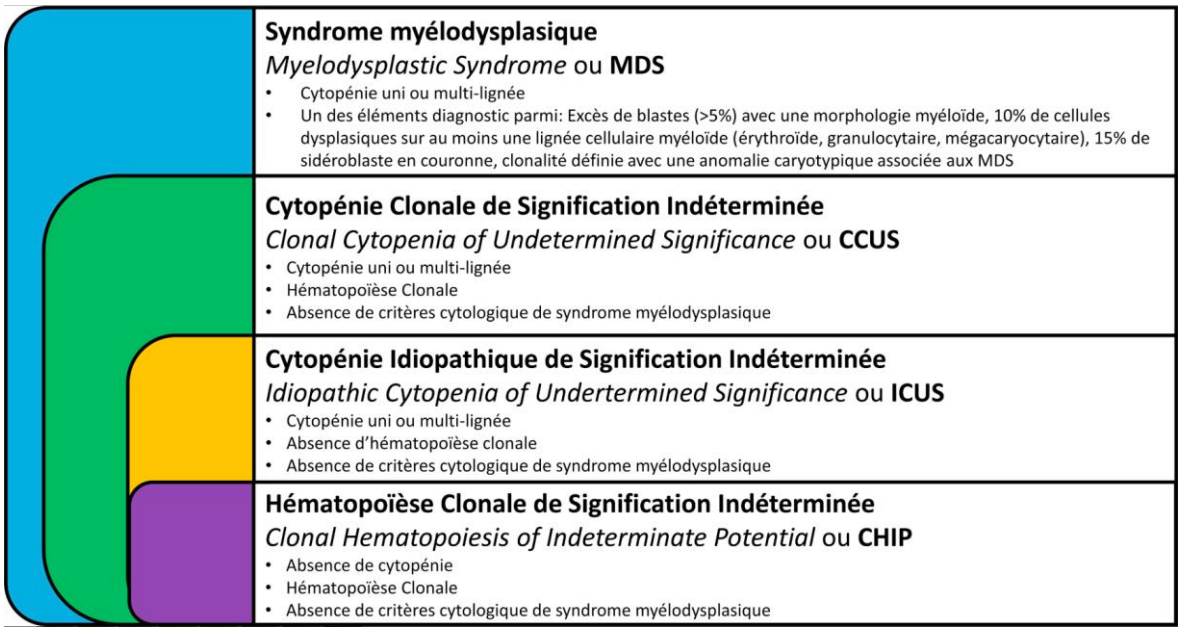


Figure 2 : Evolution de l'hématopoïèse clonale (4)

Cependant, la majorité des LAM apparaissent de-novo sans phase chronique cliniquement «visible ». Ce diagnostic tardif, à une phase équivalente à un cancer métastatique en explique d'ailleurs, très probablement le mauvais pronostic. Dans ce cas, le clone leucémique au diagnostic présente le plus souvent plusieurs altérations moléculaires qui concourent ensemble à la prolifération et à la dominance du clone malin sur l'hématopoïèse normale.

Les approches par séquençage de nouvelle génération (NGS) ont permis de caractériser le « paysage » de ces anomalies génétiques puisqu'une mutation somatique est retrouvée dans 97.3% des LAM (5).

L'équipe du "Cancer Genome Atlas Research Network" a caractérisé 200 échantillons de patients atteints de LAM par séquençage de génome entier en association à l'analyse morphologique et cytogénétique (6). Près de 2300 mutations d'un seul nucléotide et 270 insertions ou délétions ont été observées. Les échantillons ont été regroupés en 10 groupes selon la présence de gènes de fusion récurrents, du risque cytogénétique ou de la présence de mutation du gène *TP53* (Figure 3A). Ainsi, ils montrent que le nombre de mutations somatiques est différent selon le groupe analysé avec un nombre inférieur pour les LAM avec réarrangement Mixed-lineage leukemia (MLL) et supérieur pour les LAM avec transcrit RUNXT1-RUNX1. Ainsi, 23 gènes ont été identifiés comme ayant une prévalence plus élevée dans les LAM et dont il serait intéressant de faire le génotypage en pratique clinique. Les plus fréquents sont *FLT3, NPM1, DNMT3A, IDH1, IDH 2 et TET2* (figure 3B). Cette équipe a également montré l'hétérogénéité clonale puisque plus de la moitié des patients avaient au moins 2 clones leucémiques différents (figure 3C).

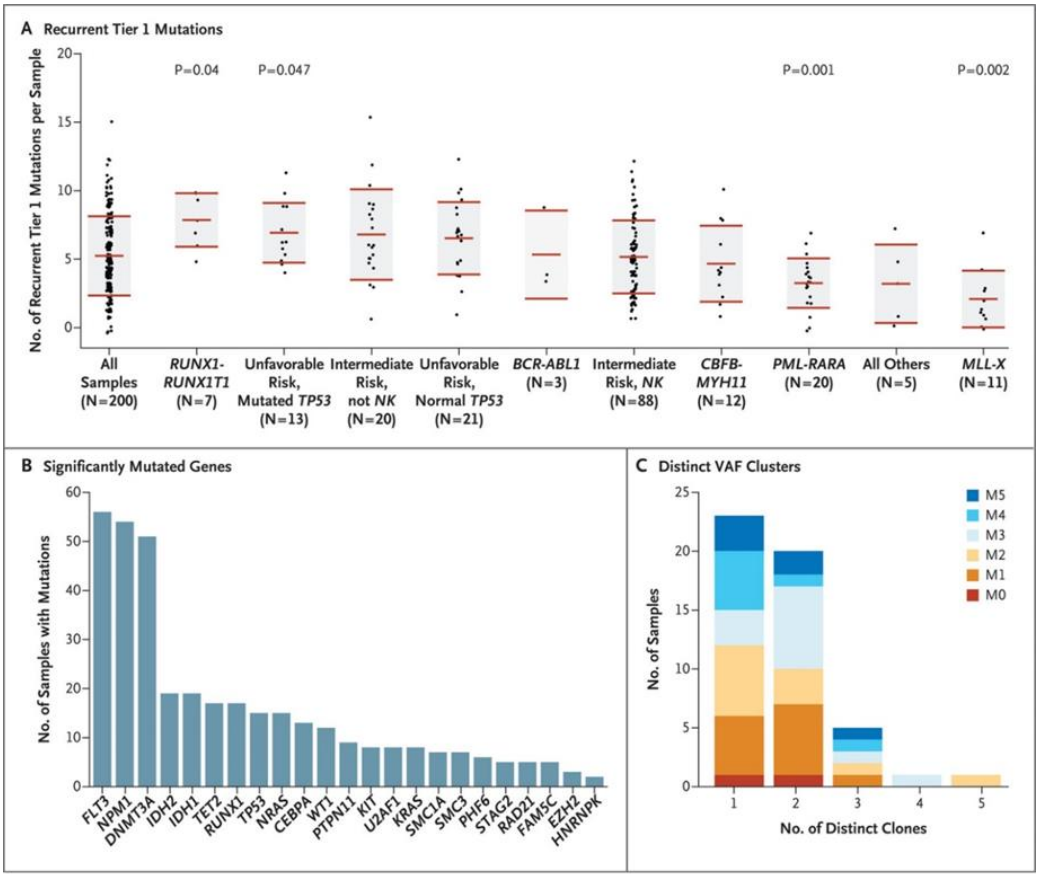


Figure 3 : « Paysage » mutationnel dans les LAM A) le nombre de mutation par groupe de patients, B) les principales mutations retrouvées et C) le nombre de clones par échantillons (6)

On observe que ces différentes anomalies moléculaires sont fréquemment associées à d'autres mutations, dont la signification n'est pas toujours bien définie due à la complexité de la cooccurrence des mutations (cf figure 4 et 5).

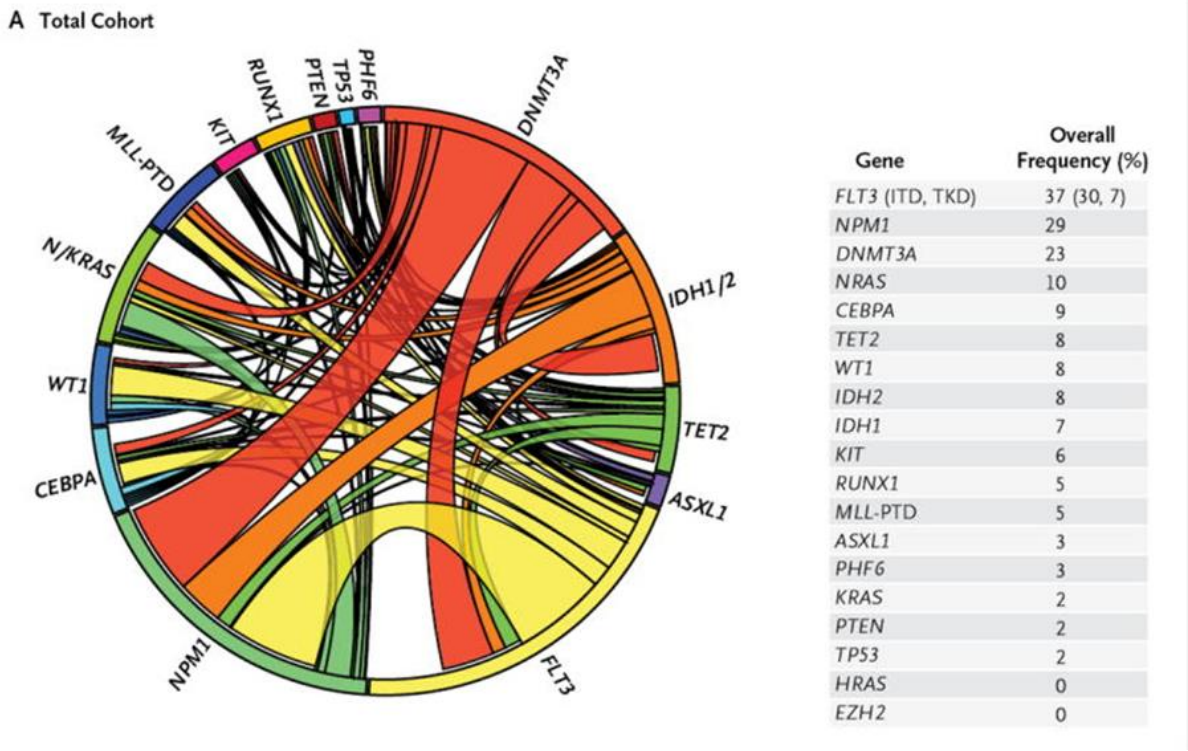


Figure 4 : Complexité des mutations dans les LAM (5)

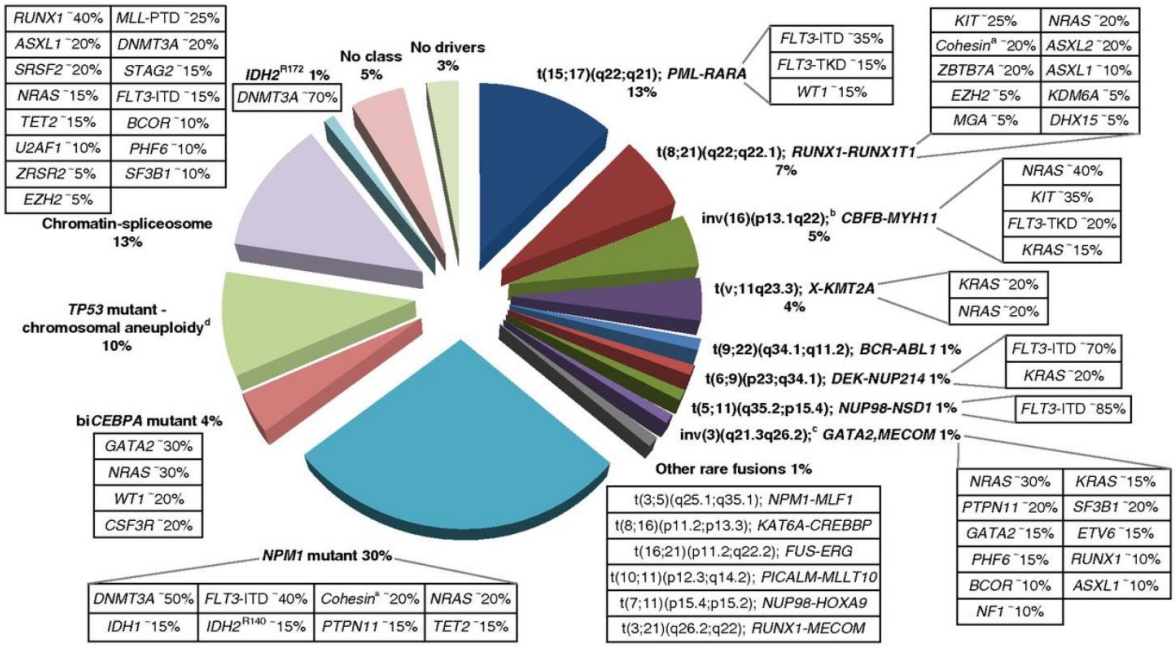


Figure 5 : anomalies moléculaires et cooccurrence retrouvées dans les LAM (7)

Le vieillissement joue un rôle important dans l'apparition d'une population de progéniteurs hématopoïétiques mutés. Le stress oxydatif (notamment induit par une exposition à divers toxiques, radiothérapie ou chimiothérapie), les différents épisodes inflammatoires et infectieux, aigus ou chroniques, participent à l'accumulation d'anomalies génétiques.

Le type d'anomalie générée conditionne le risque d'évoluer vers une LAM. En effet, certaines mutations vont générer un clone très compétitif, qui a un risque élevé d'évolution vers une LAM. Pour exemple, la présence d'un clone portant une mutation de *TP53, IDH1* ou *IDH2* est associée à un risque très élevé (13.9/100 000 et 12.6/100 000 par an) tandis qu'une CHIP avec *DNMT3A* a un risque d'acutisation plus faible de 4.6/100 000 par an (4).

La figure 6 illustre les facteurs favorisant la sélection d'une hématopoïèse clonale, ainsi, une mutation du gène *TET2* est associée à un risque plus faible d'évoluer vers une LAM tandis qu'une mutation du gène *TP53* ou du gène *NPM1* est associée à un risque plus élevé.

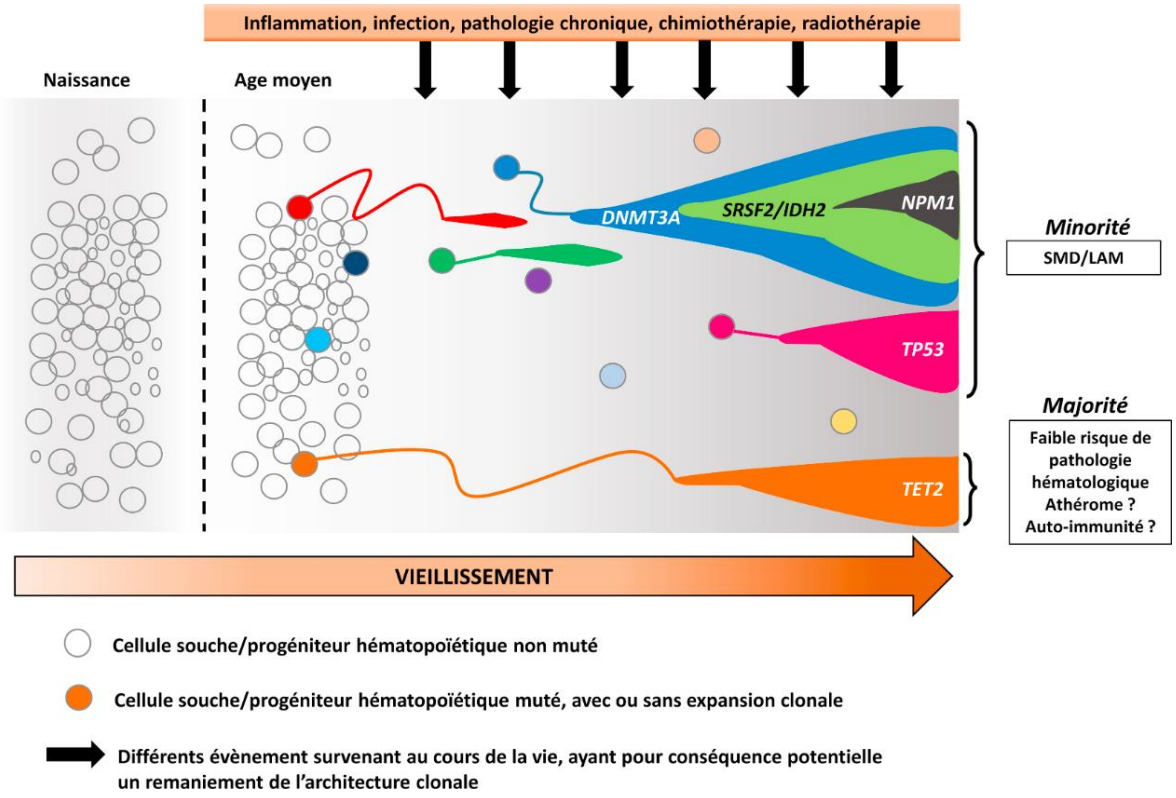


Figure 6 : facteurs favorisants le développement d'une hématopoïèse clonale (4)

2.1.3 Présentation clinique

Les symptômes présentés par les patients sont les conséquences de l'envahissement par les cellules leucémiques.

L'envahissement médullaire entraîne une décroissance des cellules normales expliquant la symptomatologie généralement commune aux LAM qui est liée aux cytopénies sanguines. Les patients peuvent donc présenter un syndrome anémique, un syndrome infectieux et un syndrome hémorragique.

Le syndrome tumoral est inconstant et les adénopathies sont rares. L'hyperplasie gingivale, la splénomégalie et les localisations cutanées (leucémides) sont plus fréquentes dans les LA à composante monocytaire.

Il existe deux manifestations souvent liées à une forte hyperleucocytose pouvant nécessiter une prise en charge en urgence (8).

La coagulation intravasculaire disséminée, survenant principalement dans les LA promyélocytaires avec PML – RARA (OMS 2016) ou LAM 3 (FAB) est une coagulopathie induite par la formation diffuse de petits caillots consommant les protéines de la coagulation et les plaquettes. Elle est dépistée par la présence d'une thrombopénie, une hypofibrinogénémie, une diminution du temps de prothrombine et une élévation des D-Dimères et monomères de fibrines (9). Une transfusion plaquettaire et de plasma frais congelé doit être envisagée de manière précoce.

La seconde manifestation nécessitant une prise en charge en urgence est la leucostase. Celle-ci peut être suspectée lors de manifestations neurologiques ou respiratoires. Elle est due à une accumulation de cellules tumorales entraînant une obstruction des petits vaisseaux sanguins. Un traitement cytoréducteur doit être envisagé dès la suspicion de la leucostase.

2.1.4 Diagnostic et classifications internationales

Le diagnostic des leucémies aigües myéloblastiques se déroule en plusieurs étapes (7).

L'analyse morphologique, réalisée lors d'une numération formule sanguine sur 200 cellules d'un frottis sanguin et de 500 cellules d'un étalement médullaire est un élément déterminant du diagnostic. Un compte de cellules blastiques >20% dans la moelle définit la LAM (exception faite pour les LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes telles que la translocation t(15:17)(q22;q21), t(8:21)(q22;q22) ou l'inversion du chromosome 16 inv16(p13.1;q22) qui définissent d'emblée la pathologie). Cette analyse morphologique permet une classification des LAM selon la classification FAB (French-American-British classification) qui regroupe les LAM en différents sous types cytologiques correspondant au type de progéniteurs à l'origine du clone (cf figure 7)

FAB subtype	Name
M0	Undifferentiated acute myeloblastic leukemia
M1	Acute myeloblastic leukemia with minimal maturation
M2	Acute myeloblastic leukemia with maturation
M3	Acute promyelocytic leukemia (APL)
M4	Acute myelomonocytic leukemia
M4eo	Acute myelomonocytic leukemia with eosinophilia
M5	Acute monocytic leukemia
M6	Acute erythroid leukemia
M7	Acute megakaryoblastic leukemia

Figure 7 : Classification cytologique FAB des LAM (10)

La classification de cytologique FAB a une valeur pronostique limitée car n'intégrant pas les données moléculaires. Cependant, elle est toujours utilisée en pratique clinique puisqu'elle permet de classer la pathologie dès le diagnostic cytologique, sans attendre le complément génétique et en particulier l'identification

rapide des LAM 3, qui peut permettre la mise en route du traitement spécifique par Acide tout-trans rétinoïque.

L'analyse immunophénotypique des cellules leucémiques permet de préciser la nature et l'appartenance à une lignée des cellules leucémiques. L'European Leukemia Net (ELN) propose un panel de marqueurs fortement recommandés et un panel étendu (11). On peut ainsi citer les marqueurs granulocytaires CD65 et MPO cytoplasmique, les marqueurs monocytaires CD14, CD36 et CD64, les marqueurs érythroïdes : CD235a (glycophorine A) et CD36 et les marqueurs mégacaryocytaires CD41 (glycoprotéine IIb/IIIa) et CD61 (glycoprotéine IIIa).

L'analyse génétique (cytogénétique et moléculaire) est indispensable pour permettre la classification de la pathologie, notamment dans le groupe des « LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes ». Environ 60% des LAM présentent un caryotype anormal lié à la présence d'anomalies acquises (12). Ces anomalies, peuvent être exclusives ou s'additionner sous forme de caryotypes complexes. Les translocations récurrentes induisent le plus souvent la formation d'un gène chimérique codant pour un transcrit et une protéine de fusion, ou dans des cas plus rares, la sur-expression d'un oncogène via sa localisation près de séquences promotrices. Les plus courantes sont les translocations t(8;21)(q22;q22) (associée au transcrit de fusion RUNXT1-RUNX1), t(15;17)(q24;q21) (associée au transcrit de fusion PML-RARA), les inversions inv(16)(13q22) (associée au transcrit de fusion CBFB-MYH11), t(6;9)(p23;q34) (associée au transcrit de fusion DEK-NUP214), inv(3)(q21;q26), les t(9;11)(p21.3;q23.3) (associée au transcrit de fusion MLLT3-KMT2A). Si la majorité des patients présentant des anomalies cytogénétiques ne possèdent que une à deux altérations chromosomiques, environ 10% des patients présentent un caryotype dit complexe défini par la présence d'au moins trois anomalies chromosomiques (et l'absence d'anomalie de bon pronostic).

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) propose une classification des LAM révisée en 2016 qui inclut ces caractéristiques génétiques ou à défaut les caractéristiques morphologiques des cellules leucémiques. (13) (tableau I).

Cette classification évolue au fur et à mesure des découvertes des différents mécanismes physiopathologiques à l'origine de ces maladies.

Table 1. WHO classification of AML and related neoplasms

Types	*Genetic abnormalites*
AML with recurrent genetic abnormalities	AML with t(8:21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1
	AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11
	APL with PML-RARA
	AML with t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A
	ML with t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214
	AML with inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM
	AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1
	AML with BCR-ABL1 (provisional entity)
	AML with mutated NPM1
	AML with biallelic mutations of CEBPA
	AML with mutated RUNX1 (provisional entity)
AML with myelodysplasia-related changes	
Therapy-related myeloid neoplasms	
	AML with minimal differentiation
	AML without maturation
	AML with maturation
	Acute myelomonocytic leukemia
	Acute monoblastic/monocytic leukemia
	Acute erythroid leukemia
	Pure erythroid leukemia
	Acute megakaryoblastic leukemia
	Acute basophilic leukemia
	Acute panmyelosis with myelofibrosis
Myeloid sarcoma	
Myeloid proliferations related to Down syndrome	Transient abnormal myelopoiesis
	ML associated with Down syndrome

Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; APL, acute promyelocytic leukemia; ML, myeloid leukemia; WHO, World Health Organization.

Tableau I : classification OMS 2016 des LAM (13)

On peut noter que la révision de la classification des hémopathies myéloïdes par l'OMS en 2016 a défini une nouvelle entité pour les hémopathies myéloïdes héréditaires : les « LAM avec prédisposition familiale ». Celles-ci comportent des anomalies génétiques constitutionnelles entraînant un risque élevé d'évolution vers une leucémie aigue myéloblastique.

2.1.5 Anomalies cytogénétiques et moléculaires et facteurs pronostiques

Il existe de nombreuses anomalies cytogénétiques et moléculaires qui permettent de classer les pathologies, de déterminer le pronostic et de suivre la maladie résiduelle (7).

Le groupe international ELN a proposé de classer les patients selon le profil génétique des cellules tumorales en groupes pronostiques (7) (Tableau II).

Risk category*	Genetic abnormality
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1); *RUNX1–RUNX1T1*
	inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB–MYH11*
	Mutated *NPM1* without *FLT3*–ITD or with *FLT3*–ITD^{low}†
	Biallelic mutated *CEBPA*
Intermediate	Mutated *NPM1* and *FLT3*–ITD^{high}†
	Wild-type *NPM1* without *FLT3*–ITD or with *FLT3*–ITD^{low}† (without adverse-risk genetic lesions)
	t(9;11)(p21.3;q23.3); *MLLT3–KMT2A*‡
	Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse
Adverse	t(6;9)(p23;q34.1); *DEK–NUP214*
	t(v;11q23.3); *KMT2A* rearranged
	t(9;22)(q34.1;q11.2); *BCR–ABL1*
	inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2,MECOM(EVI1)*
	−5 or del(5q); −7; −17/abn(17p)
	Complex karyotype,§ monosomal karyotype‖
	Wild-type *NPM1* and *FLT3*–ITD^{high}†
	Mutated *RUNX1*¶
	Mutated *ASXL1*¶
	Mutated *TP53*#

Tableau II : Stratification du risque suivant le profil génétique selon l'ELN (7)

Ainsi, sont associés à un pronostic favorable les patients ayant une cellule tumorale avec la présence d'une translocation t(8:21)(q22;q22) (associée au transcrit de fusion RUNX1T1-RUNX1), de l'inversion du chromosome 16 inv16(p13.1;q22) (associée au transcrit de fusion CBFB-MYH11), de mutation du gène *nucléoplasmine 1* (*NPM1*) (sans duplication de FLT3-ITD ou avec un faible ratio allélique <0.5) ou une mutation bi-allelique du gène *CEBPA (CCAAT-/enhancer binding protein alpha)*. Les LA promyélocytaire avec translocation t(15:17)(q22;q21) sont un cas particulier, de pronostic favorable car il existe un traitement spécifique de cette pathologie. Elles illustrent parfaitement l'intérêt des thérapies dites ciblées. Dans les LAM pédiatriques, la translocation t(1;11)(q21;q23) (KMT2A-MLLT11) est également de pronostic favorable (14).

Sont associés à un pronostic défavorable les patients ayant des cellules tumorales avec une translocation t(6;9)(p23;q34.1) (DEK-NUP214), un réarrangement MLL t(11q23.3;V), une translocation t(9;22)(q34.1;q11.2) (générant le transcrit de fusion BCR-ABL1). Une inversion du chromosome 3 inv(3)(q21.3q26.2) (réarrangement GATA2, MECOM(EVI1)), une monosomie chromosome 5 ou une délétion del(5q), une monosomie du chromosome 7, du chromosome 17 ou anomalie 17p, un caryotype complexe ou monosomal. Sont également de pronostic défavorable les cellules leucémiques avec duplication FLT3-ITD avec un ratio allélique élevé >0.5 sans mutation *NPM1*, ainsi que la présence de mutation *RUNX1*, *ASXL1* ou *TP53*.

Les mutations de l'IDH 1 sont également considérées de mauvais pronostic par certains auteurs, mais non retenue par l'ELN (15).

On retrouve dans les LAM de pronostics intermédiaires la présence d'une mutation NPM1 (avec duplication FLT3-ITD avec un ratio allélique élevé >0.5), l'absence de mutation NPM1 sans duplication de FLT3-ITD ou avec un faible ratio allélique <0.5), la translocation t(9;11)(p22;q23) (réarrangement MLLT3-KMT2A). Sont également inclus les patients ayant un statut cytogénétique ou moléculaire ne permettant pas de classer les patients en groupe pronostic favorable ou défavorable.

Environ 40% des cas de LAM ont un caryotype sans anomalie cytogénétique (12). Ces patients constituent un groupe hétérogène considère comme de pronostic

intermédiaire. La caractérisation moléculaire a permis d'identifier plusieurs sous type de LAM-CN reflétant mieux la diversité clinique et pronostic de ces patients

Les groupes de risque traduisent une probabilité de survie différente selon le type d'anomalie génétique.

La figure 8 illustre la probabilité de survie selon le type d'anomalie cytogénétique ou moléculaire (16). En plus des anomalies cytogénétiques et moléculaires citées précédemment, on retrouve également un pronostic très péjoratif lorsque TP53 est muté et associé à un caryotype complexe. L'association de mutation ASXL1 et SRSF2 semble également être de très mauvais pronostic.

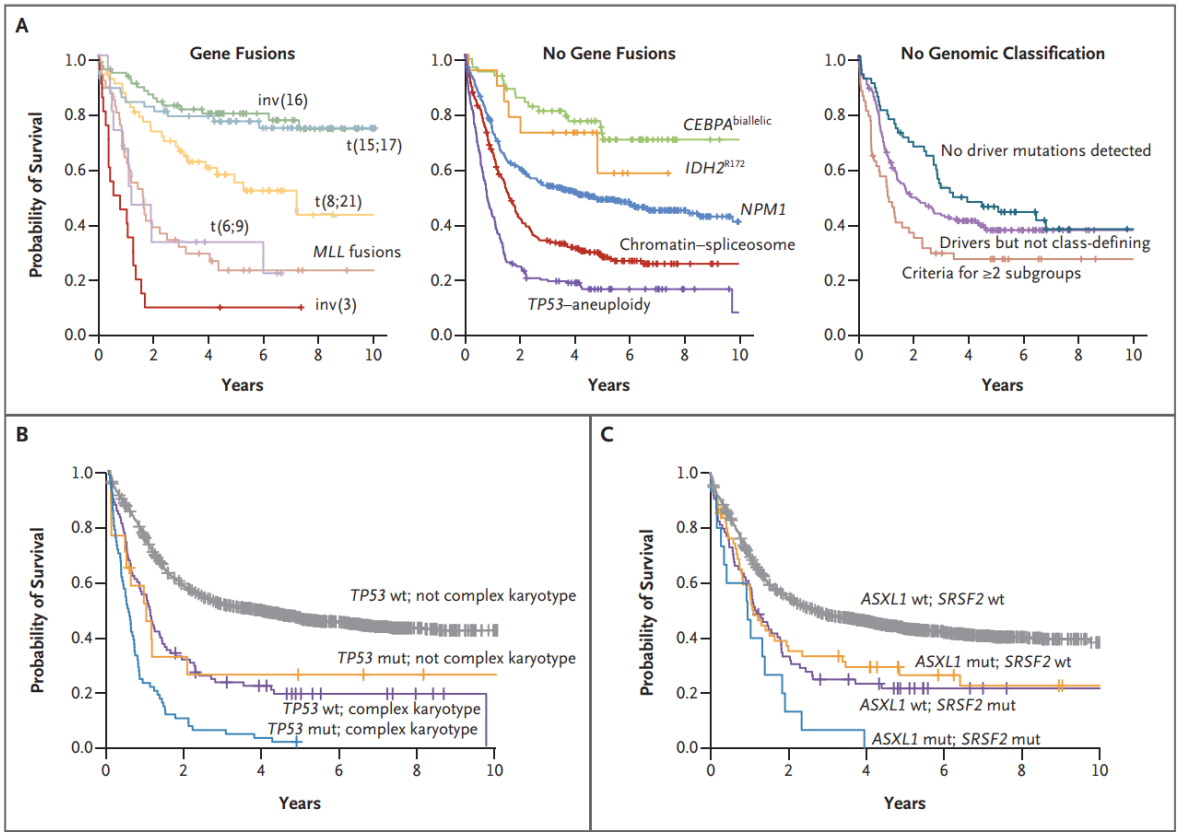


Figure 8 : probabilité de survie selon le type d'anomalie génétique (16)

2.1.6 Prise en charge thérapeutique

La prise en charge des LAM vise à obtenir une rémission complète durable (17,18). Elle est généralement divisée en plusieurs phases. La phase d'induction comprenant une chimiothérapie classique avec 3 jours d'anthracyclines suivie de 7 jours de cytarabine. La phase de consolidation comprend une association de chimiothérapies qui peut être complétée par une allogreffe de moelle osseuse suivant les facteurs de risque cliniques, moléculaires et les comorbidités. Dans certains cas spécifiques, des thérapies ciblées sont utilisées.

Un modèle intéressant est le cas particulier des LA promyélocytaires avec PML – RARA (OMS 2016) ou LAM 3 (FAB). En effet, un traitement spécifique à cette pathologie est disponible, l'acide tout-trans rétinoïque (ATRA). Cette molécule a pour effet de lever le blocage de maturation provoqué par la protéine PML-RARA et ainsi d'induire une différenciation des blastes leucémiques. Ce modèle de traitement est une véritable réussite puisque la survie des patients atteints de LA promyélocytaire avec PML – RARA est de 94.8% à 5 ans après le diagnostic (19).

Les nouvelles thérapies des LAM en cours d'études cliniques, tel que les inhibiteurs de FLT3 ou d'IDH, tendent vers une médecine personnalisée, avec des thérapies indiquées lors d'anomalies génétiques précise. Cependant, les résultats sont encore modestes. Un anticorps monoclonal a également été développé, le Gemtuzumab Ozogamicine (GO), indiqué, en association avec une chimiothérapie standard, dans le traitement des LAM d'expression positive du CD33 de novo (20).

2.1.7 Voies fonctionnelles en jeu

Les différentes anomalies cytogénétiques et moléculaires induisent une dérégulation de voies fonctionnelles qui vont participer au processus leucémique.

Anomalies dues à un réarrangement chromosomique

La protéine MLL est une histone méthyltransférase jouant un rôle important dans la régulation épigénétique. Elle est présente dans tous les progéniteurs hématopoïétiques. Lors d'un réarrangement du gène *MLL*, notamment avec des gènes *AF4, AF9, ENL, AF10* ou *ELL,* celui-ci a un effet pro-leucémogène. Les protéines MLL ainsi modifiées ont la capacité de déréguler la transcription de leur gène cible (21).

Les protéines RUNX sont composées d'une sous-unité α, codée par les gènes *RUNX1, RUNX2* et *RUNX3* et une sous unité β, codée par le gène *CBFβ*. Les remaniements les plus fréquents de « core binding protein » (CBF) sont présents dans les LAM avec t(8:21)(q22;q22) (RUNXT1-RUNX1) et l'inv16(p13.1;q22) (CBFβ-MYH11). Ainsi, la protéine chimérique RUNX1T1-RUNX1 entraîne la formation de complexes inhibant la transcription des gènes cibles tel que *PTEN, BCL2, CEBPA, ARF* ou *PSGL1*. La perte de fonction de la protéine RUNX1 est associée à une perte (tout ou en partie) du domaine de trans-activation (21).

Les gènes *RAS* (*HRAS*, *NRAS* et *KRAS*), lorsqu'ils sont mutés entraînent une activation constitutive de ces protéines responsables de la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaire. Une mutation des gènes *RAS* intervient dans environ 50% des LAM CBF.

D'une part, le gène *RARα* code pour une protéine qui active, en présence de l'acide rétinoïque, la transcription de nombreux gènes impliqués dans la différenciation. D'autre part, la protéine suppresseur de tumeur PML est essentielle pour la formation de la structure nucléaire. La protéine de fusion PML-RARα (dans les LAM 3 - FAB), induit une inhibition du recrutement de complexes contenant une histone méthyltransférase. L'ATRA permet une dissociation de ce complexe répresseur (21).

Anomalies dues à des mutations ponctuelles

Le gène *FLT3* code pour un récepteur membranaire de la famille des tyrosines kinases ayant pour rôle la régulation et la prolifération cellulaire. La liaison du ligand FLT entraîne une dimérisation du récepteur et une cascade de phosphorylation, qui termine par l'activation des voies de signalisation MAP kinase, STAT et AKT/PI3 kinase. Dans les LAM, la duplication en tandem interne (FLT3-ITD) entraîne une activation constitutive du récepteur FLT3 (21).

La protéine codée par le gène *NPM1* est une protéine chaperonne, impliquée dans l'assemblage ribosomal des protéines, le contrôle de la réplication du centrosome et dans la régulation de gènes suppresseurs de tumeurs tels qu'ARF. Cette protéine navigue entre les compartiments cellulaires et participe au transport de particules pré-ribosomale de réponse au stress, telles que les UV et l'hypoxie. Elle participe au maintien de la stabilité génomique ainsi qu'à la régulation de la transcription de l'ADN par modulation de la condensation de la chromatine. Les mutations du gène *NPM1* intervenant dans les LAM entraînent une modification de sa localisation nucléaire, ayant pour effet un dysfonctionnement des protéines telles qu'ARF, protéine régulatrice de TP53, qui ne peut pas intervenir en tant que suppresseur de tumeur (21).

Le gène CEBPA est considéré comme gène suppresseur de tumeur par inhibition de la prolifération cellulaire. Il est exprimé exclusivement dans les cellules myélo-monocytaires et conditionne la maturation vers la lignée granulocyaire.

2.2 Mécanismes épigénétiques

Afin de réguler l'expression des gènes de manière réversible et adaptative, les cellules utilisent des mécanismes épigénétiques. Parmi ces mécanismes, nous pouvons citer l'acétylation des histones, la régulation de la traduction par les micro-ARN ou encore la méthylation des cytosines.

Dans ce manuscrit, nous parlerons principalement de la méthylation des cytosines.

2.2.1 Mécanismes de méthylation et différents dérivés de la cytosine

La 5-méthylCytosine (5mC) est produite par la méthylation d'une cytosine en position C5, réaction catalysée par une DNA méthyltransférase (DNMT) en utilisant le S-Adenosylmethionine (SAM) comme donneur de groupement méthyl (Figure 10). La formule chimique de la 5mC est représentée sur la figure 9a. Elle est présente dans le génome humain à hauteur d'environ de 1% des cytosines à 5% selon les auteurs. L'enzyme DNMT1, localisée en région chromosomique 19p13.2 assure la propagation de cette méthylation lors de la division cellulaire (22). La méthylation *de novo* est assurée par les enzymes DNMT3A (localisée en région chromosomique 2p23) et DNMT3B. Ces enzymes ciblent les promoteurs dans les complexes ayant d'autres répresseurs épigénétiques, tels que les histones déacétylases et les répresseurs H3K9, essentiels pour maintenir une répression complète et stable des gènes dont les promoteurs sont méthylés. La méthylation des cytosines a généralement lieu au niveau des dinucléotides CpG, que l'on trouve en grandes quantités au sein de régions appelées îlots CpG. Un îlot CpG est défini par une région d'au minimum 200 paires de bases avec une fréquence de CpG > 0.6 (23).

La méthylation des cytosines joue un rôle essentiel notamment dans la différentiation cellulaire ou l'inactivation du chromosome X chez les femmes (24). Dans les cellules cancéreuses et notamment leucémiques, on observe une hypométhylation globale de l'ADN. Cependant, l'expression de nombreux gènes suppresseurs de tumeurs peut être inhibée par une hyperméthylation de leur séquence promotrice (25,26). On peut citer comme exemple le gène p15 qui,

lorsque sa séquence promotrice est méthylée, provoque une entrée incontrôlée dans le cycle de division cellulaire ou bien le gène MGMT dans les cancers colorectaux et cérébraux qui, en lien avec p53 est impliqué dans la réparation de l'ADN (27).

Il a été démontré en 2009 que le génome humain ne contenait pas seulement de la 5mC mais aussi de la 5-hydroxyméthylCytosine (5hmC). La 5hmC peut être considérée comme la 6ème base du génome humain (28). La formule chimique de la 5hmC est représentée sur la formule 9b. Sa présence dans l'ADN varie énormément suivant les tissus. Son taux peut être d'environ 0.001% des cytosines dans la rate et peut atteindre jusqu'à 0.7% des cytosines dans le cerveau (23,29).

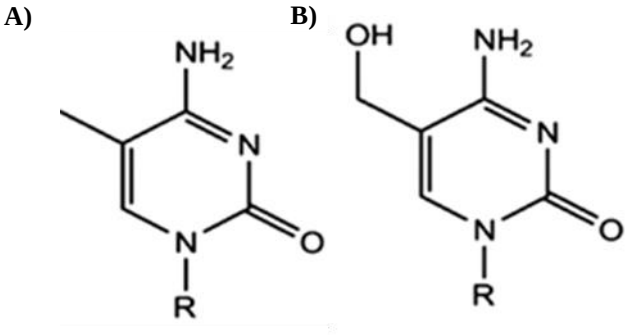


Figure 9 : Formules chimiques de A) la 5mC et B) la 5hmC

La production de 5hmC résulte de l'hydroxylation du groupement méthyl de la 5mC par des enzymes de la famille Ten-Eleven Translocation (TET) en présence de l'α-KétoGlutarate (α-KG). Les autres dérivés oxydés 5-formylcytosine (5fC) et 5-carboxycytosine (5caC) sont également produits à partir de la 5hmC par l'intermédiaire d'enzymes TET et de l'α-KG. L'enzyme TET1 (dont le gène est localisé en position 10q21) serait impliquée dans la différenciation cellulaire mais ne serait pas critique pour le développement embryonnaire *in vivo* (30). L'enzyme TET2 (dont le gène est localisé en position chromosomique 4q24) semble essentielle pour la différentiation des progéniteurs myéloïdes dans la lignée granulomonocytaire (31). Quant à TET3, elle semble essentielle pour l'embryogénèse puisqu'une répression complète du gène semble létale *in utero* (32). La restauration de la cytosine est ensuite réalisée à partir de la 5fC et de la 5caC à l'aide de l'enzyme Thymine DNA glycosylase (TDG dont le gène est

localisé en position 12q24), enzyme du mécanisme de Réparation de l'ADN par Excision de Base (BER).

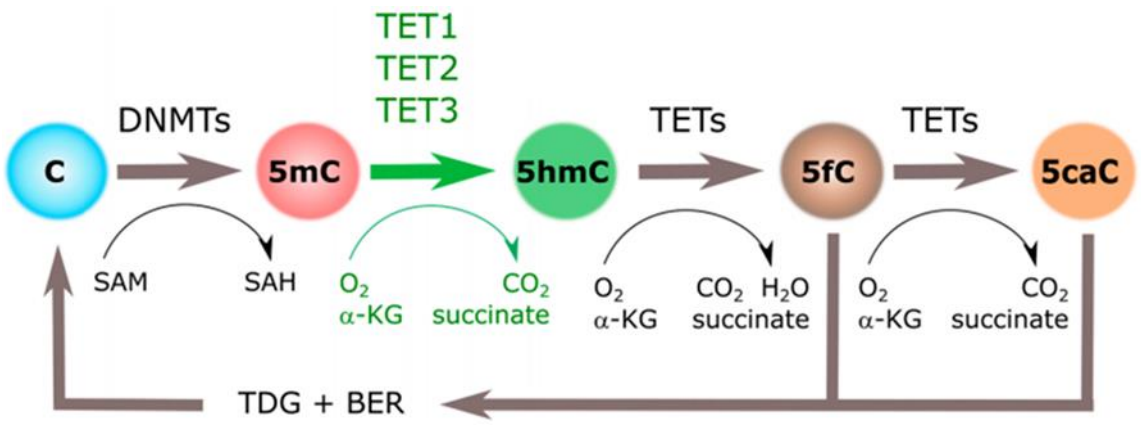


Figure 10 : Schéma représentant le cycle de méthylation et de déméthylation de l'ADN (28).

Les enzymes Isocitrate DésHydrogénase (IDH) jouent un rôle clé dans ces processus car elles sont responsables de la formation de l'α-KG, cofacteurs des enzymes TET. Il existe 2 isoformes d'IDH : IDH 1 présente dans le cytoplasme et IDH 2 présente dans les mitochondries. Les localisations chromosomiques des gènes codant pour IDH1 et IDH2 sont respectivement 2q33.3 et 15q26.1.

Les études du rôle physiologique de la 5hmC sont aujourd'hui peu nombreuses. En plus d'être un intermédiaire dans le processus actif de déméthylation de l'ADN, la 5hmC, ainsi que les deux dérivés oxydés 5fC et 5caC jouent en tant que base indépendante, un rôle important dans le contrôle de l'expression des gènes. En effet, la variabilité de distribution selon l'organe suggère que les dérivés oxydés de la cytosine contribuent de manière majeure à l'expression des gènes spécifiques aux tissus (28). Cela en fait une marque épigénétique unique, associée à une transcription active du gène. De plus, il a été montré dans un modèle érythroïde qu'une augmentation de l'expression des gènes était associée à une accumulation de 5hmC (26).

L'équilibre entre méthylation, hydroxylation et déméthylation des cytosines permet donc une régulation de l'expression des gènes, qui participe à l'homéostasie cellulaire et tissulaire.

2.2.2 Modification des cytosines dans les leucémies aigües myéloblastiques

De manière intéressante, la proportion de LAM avec mutation de gènes régulateurs de la méthylation des cytosines est très importante (44%). Environ 20% à 26% des LAM ont une mutation de DNMT3A, la proportion étant plus faible pour les patients atteints de SMD (10%) (23). Il semblerait qu'au sein des groupes à pronostic défavorable, la présence de mutation DNMT3A soit associé à une moins bonne survie globale (33) et que la présence de DNMT3A persisterait après chimiothérapie.

Les gènes codant pour les enzymes IDH sont mutés dans 20% des LAM avec une proportion d'IDH2 mutée supérieure à IDH1. Il a été montré que les mutations codant pour les protéines modifiées R132/R100 dans IDH1 et R140/R172 dans IDH2 génèrent un phénotype de gain de fonction qui conduit à une accumulation de 2-HG dans les cellules et les tissus. Le 2-HG agit comme un onco-métabolite en raison de sa similarité structurelle avec l'a-KG, ce qui interfère avec les enzymes nécessitant l'α-KG et notamment les enzymes TET (34). La valeur pronostique de ces mutations reste cependant discutée.

Le gène codant pour l'enzyme TET2 est muté dans 8.5% à 27.4% des LAM et le gène Wilm's Tumor 1 (WT1, localisé sur le chromosome 11p13) est muté dans 6% des LAM (6,35). Concernant l'enzyme TET1, il a été montré qu'elle est une cible directe de la protéine de fusion MLL dans les leucémies aigües avec réarrangement MLL. Ceci a pour effet une surexpression de TET1 de manière aberrante dans les LAM avec réarrangement MLL avec une hyper hydroxyméthylation globale de l'ADN (26,36).

Lors de l'hématopoïèse normale, DNMT3A est responsable de la méthylation « *de novo* » de l'ADN. La principale enzyme qui catalyse la conversion de 5mC en 5hmC est TET2, réaction améliorée par la liaison à WT1 (figure 11). Dans les CSH de LAM et SMD, les mutations de DNMT3A induisent une méthylation aberrante de l'ADN. Les mutations de TET2 entraînent une altération de l'hydroxylation de l'ADN. De plus, les mutations de IDH entraînerait une forte hyperméthylation de l'ADN expliquée par l'accumulation de 2-Hydroxyglutarate (au lieu de l'α-KG) qui va entrainer une rétro inhibition sur les enzymes α-KG-dépendantes comme TET2

(37). Les mutations de WT1 entraînent aussi une diminution de l'activité de TET2 et une diminution des taux de 5hmC (23,38).

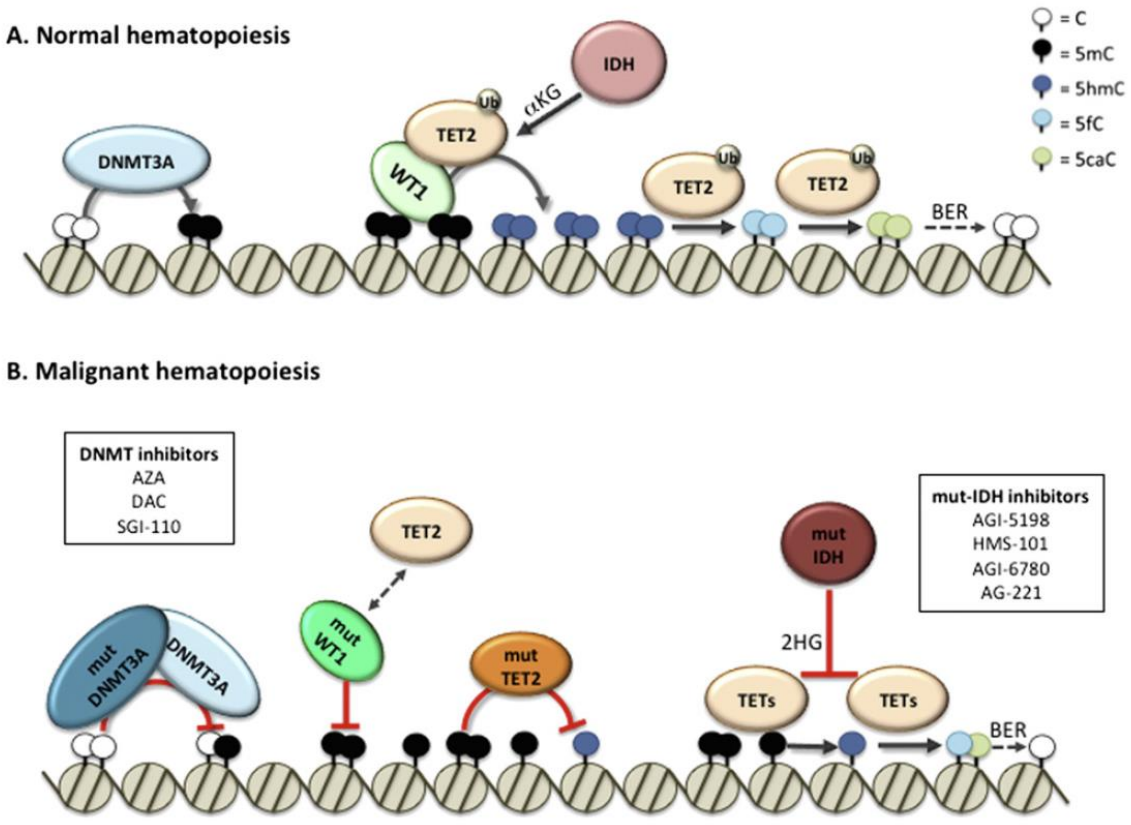


Figure 11 Schéma montrant A) les acteurs de la méthylation des cytosines lors de l'hématopoïèse normale B) L'impact des différentes mutations dans les hémopathies myéloïdes (23)

De manière plus globale, il a été montré dans les CSH que plus une cellule hématologique est mature, plus le taux de 5hmC diminue. De plus, on observe dans les LAM une hyperméthylation focale avec une hypométhylation globale (23). Bien que les mécanismes ne soient pas encore bien élucidés, les liens entre méthylation des cytosines et hémopathies myéloïdes semblent évidents puisque les agents hypométhylants (azacitidine et décitabine) sont couramment utilisés dans la pratique clinique en traitement des SMD (39). Il a également été observé une augmentation des taux de 5hmC lors de l'utilisation d'agents hypométhylants. (40,41).

De manière paradoxale, il semblerait que la perte de fonction de TET2 serait associée à une diminution plutôt qu'à une augmentation de la 5mC. Les mutations

de TET2 seraient également associées à une meilleure réponse aux agents hypométhylants tel que l'azacitidine (42).

Il est également intéressant de noter que les traitements inhibiteurs de l'IDH : enasidenib actif sur l'enzyme IDH2 R140 et R172 et ivosidénib actif sur l'enzyme IDH1 mutée R132 sont actuellement en phase d'études cliniques (43,44).

2.3 Le fer

2.3.1 Métabolisme du fer chez l'Homme

Chez l'Homme, le fer est principalement utilisé pour la synthèse de l'hémoglobine qui contient 80% du fer de l'organisme. (45)

La majorité du fer requis par le métabolisme est un fer recyclé, principalement de l'hémoglobine des globules rouges sénescents. En effet, le cycle du fer dans l'organisme s'effectue en circuit fermé. Les pertes sont faibles puisqu'il n'existe pas de mécanisme d'excrétion du fer. Celles-ci sont dues aux desquamations naturelles des cellules (intestins, peau) et aux saignements. Les apports sont également faibles puisqu'ils doivent simplement compenser les pertes. Ainsi, une minorité du fer ingéré est absorbée par l'organisme. Le fer est absorbé par les entérocytes duodénaux de deux manières suivant son état. Le fer ferrique (Fe^{3+}) est issu principalement de l'alimentation végétale et doit être réduit en Fe^{2+} pour être absorbé par un transporteur, le divalent metal transporter 1, dont l'expression est régulée par le taux de fer dans l'organisme. Le fer héminique est contenu dans l'hémoglobine et la myoglobine. Il est issu de l'alimentation animale et est plus facilement absorbé.

Dans l'organisme, le fer circule essentiellement à l'aide d'une protéine de transport : la transferrine qui adresse le fer aux cellules exprimant le récepteur à la transferrine 1 (TfR1) ou CD71. L'excédent de fer est stocké sous forme de ferritine principalement au sein des macrophages.

La quantité de fer circulant est régulée par une protéine synthétisée par le foie : l'hepcidine (46). Cette protéine a comme effet d'inhiber l'absorption intestinale du fer et son relargage par les macrophages, ce qui permet de prévenir les surcharges en fer. Elle est régulée principalement par l'hypoxie et l'anémie.

2.3.2 Fer et LAM

Le fer est un cofacteur essentiel pour le bon fonctionnement d'un certain nombre d'enzymes impliquées dans la prolifération cellulaire. Dans les cellules leucémiques, on observe une expression importante des TfR1, donc un flux d'entrée de fer supérieur à celui des cellules normales (48). Il a également été montré que la déplétion en fer induite par l'ajout de chélateurs du fer arrête la croissance cellulaire et entraîne une augmentation de l'apoptose. Un engagement dans la lignée monocytaire lors de la privation en fer de cellules leucémiques a été également rapporté (49).

Les patients atteints de SMD ont une érythropoïèse inefficace qui se traduit le plus souvent par une anémie. Cette anémie nécessite généralement un traitement par érythropoïétine voire des transfusions régulières en érythrocytes. Ces transfusions répétées entraînent fréquemment une surcharge en fer. Ainsi, les patients atteints de SMD ont couramment un chélateur du fer dans le traitement de leur hémopathie.

L'impact des chélateurs du fer sur ces patients est bénéfique même si les mécanismes de cette action thérapeutique ne sont pas encore élucidés. Cette surcharge en fer se traduit également par une augmentation des concentrations plasmatiques d'hepcidine.

Il semblerait également que l'hepcidine, en intégrant le dosage de ferritine, serait prédictive de la réponse à l'érythropoïétine dans les SMD (47)

2.2.3 Liens entre fer et méthylation des cytosines

Les liens entre méthylation des cytosines et LAM sont assez bien étudiés, ainsi que les rapports entre homéostasie du fer, cycle cellulaire et cellules leucémiques. Par contre, les liens entre le fer et la méthylation des cytosines sont très peu étudiés.

On peut supposer que ce lien existe puisque les enzymes TET contiennent un atome de fer (II) dans leur structure catalytique (50). De plus, il a été montré que lorsque d'autres métaux divalents comme le nickel entrent en compétition avec l'incorporation du fer dans sa structure catalytique, cela entraîne une inhibition de son activité enzymatique (51). La présence spécifique de fer dans la structure protéique est donc nécessaire à l'activité de l'enzyme et à la formation de dérivés oxydés de la 5mC. Ainsi, le fer au-delà de ces activités propre sur le cycle cellulaire et sur la prolifération tumorale pourrait potentiellement interférer avec des mécanismes de contrôle épigénétique de l'expression des gènes jouant un rôle majeur dans le processus leucémique

Dans ce contexte, un des objectif de mon travail a été d'explorer d'une part l'état de méthylation de l'ADN via la mesure de 5mc et de 5hmc sur des prélèvements de patients (en corrélation avec leur données clinico-biologiques), ainsi que les liens entre le fer et la méthylation de l'ADN dans des lignées leucémiques humaines.

3. Matériel et méthode

3.1. Privation en fer de lignées cellulaires

3.1.1 Lignées cellulaires

Nous avons choisi plusieurs modèles de lignées cellulaires représentatives de différents sous types de LAM. Ces lignées sont bien décrites dans la littérature en termes de données génomiques, épigénomiques et transcriptomiques.

Nous avons utilisé 5 lignées cellulaires commerciales. KG1 (CVCL_0374), HL60 (CVCL_0002), K562 (CCL-243) et HEL (TIB-180) sont issues de l'American Type Culture Collection (ATCC) tandis qu'OCI-AML3 (ACC 582) est issue de la German collection of microorganisms and cell cultures (DSMZ).

Selon les fournisseurs et la littérature (52), les caractéristiques des différentes lignées sont les suivantes :

- KG1 : cette lignée est issue d'un patient atteint d'une érythroleucémie transformée en LAM. Ces cellules ont comme caractéristique de se transformer en cellules dendritiques en réponse au CSF (GM-CSF, IL-4, PMA, ionomycine). Des études de transcriptomique ont montré une faible expression du gène p15 et des études de génomique une mutation du gène N-RAS (c.35G>A) ainsi que le gène de fusion FGFR1OP2-FGFR1.

- HL60 : cette lignée est issue d'un patient atteint d'une LAM promyélocytaire sans translocation t(15;17) ni transcrit PML RARA. Environ 10% des cellules se différencient spontanément. Des données de génomique montrent une mutation du gène NRAS (c.182A>T) ainsi que de p16 : CDKN2A et CDKN2C (c.434G>A et c.232C>T). Cette lignée a également comme propriété de sur-exprimer le gène WT1.

- K562 : cette lignée est issue d'un patient atteint d'une LMC acutisée avec le réarrangement bcr-abl1 (b3a2 = e14a2). Les blastes sont multipotents avec une composante érythrocytaire. Des données de génomique montrent une mutation du gène p16 : CDKN2A (c.151_457del307).

- HEL : cette lignée est issue d'un patient atteint d'une LAM 6 (classification FAB) secondaire à un lymphome de Hodgkin avec la mutation JAK2 V617F (c.1849G>T).

- OCI-AML3 : il s'agit d'une lignée issue d'un patient atteint de LAM 4 (classification FAB) avec une trisomie 8, une trisomie 1 et une trisomie 5 partielle. Des données de génomique montrent une mutation du gène NPM1 ainsi que du gène DNMT3A R882C (c.2644C>T).

Ces lignées ont été cultivées en milieu liquide selon les recommandations du fournisseur avec un milieu standard RPMI 1640, SVF 10%, Pénicilline/Streptomycine 1%, Glutamine 1% (Life Technologies) renouvelé toutes les 48h à 72h en procédant à une dilution des cellules à 0.3 M/mL. L'incubation a été réalisée à 37°C avec atmosphère enrichie à 5% de CO2. L'enceinte thermique utilisée est qualifiée et les températures sont suivies par le service biomédical du CHU de Grenoble. La numération des cellules a été réalisée à l'aide d'un hémacytomètre Micros 60® (Horiba).

3.1.2 Protocole de chélation du fer

Nous avons développé un modèle expérimental de chélation du fer suivi d'une phase de recharge en fer via l'apport de transferrine. La vérification de l'efficacité du chélateur du fer a été faite par étude du cycle cellulaire en cytométrie de flux (CMF).

Le protocole initial de chélation du fer a été défini en se basant sur les travaux de doctorat d'E. Pourcelot (48). Le milieu de culture standard est remplacé par un milieu de culture pauvre en fer (RPMI 1640 + BSA 1% (Sigma-Aldrich) + Pénicilline/Streptomycine 1% + Glutamine 1%).

La déféroxamine (DFO) (Sigma-Aldrich) est un chélateur du fer. Son ajout au milieu de culture va entraîner une déplétion du fer disponible pour la cellule. L'ajout de transferrine saturée en fer (Fe-Tf) (Sigma-Aldrich) après lavage du milieu de culture a pour effet de rendre à nouveau du fer disponible pour les cellules leucémiques. Ce réactif a été choisi pour la re-supplémentation en fer car la transferrine est le transporteur du fer *in vivo*. Le fer va être capté par les cellules via leurs récepteurs à la transferrine TfR. Le lavage consiste à récupérer le culot cellulaire par centrifugation, puis le laver deux fois par du PBS.

Nous sommes partis des conditions déterminées par E. Pourcelot que nous avons ajustées pour chacune des lignées suivant les résultats expérimentaux (Figure 12).

Figure 12 : Protocole de culture avec chélation du fer

La numération des cellules, à l'aide d'un hémacytomètre Micros 60, a été effectuée à chacune des étapes du protocole de chélation du fer. Deux échantillons distincts sous forme de culots cellulaires de 4 à 12 millions de cellules ont été collectés aux deux étapes du protocole de chélation du fer ainsi que le témoin à l'état basal cultivé en parallèle. Le protocole de chélation du fer a été réalisé pour deux conditions de concentration et temps d'incubation de DFO et Fe-Tf, chacune des conditions a été réalisée à deux reprises pour chacune des lignées cellulaires.

Nous avons ainsi testé les doses et temps d'incubations en DFO à 200 µmol/L pendant 24h et 400 µmol/L pendant 48h. La re-supplémentation par Fe-Tf a été réalisée à 20 nmol/L pendant 24h et 20 nmol/L pendant 48h.

3.1.3 Evaluation du cycle cellulaire

Nous avons cherché à déterminer les doses de DFO nécessaires pour bloquer le cycle cellulaire et les doses de transferrine nécessaires pour relancer le cycle cellulaire. Nous avons donc évalué le cycle cellulaire à chacune des étapes.

Nous avons pour cela utilisé un cytomètre de flux FACSCanto II® (BD) de la plateforme de cytométrie du CHU de Grenoble. L'analyse du cycle a été réalisée avec le kit Cycletest plus DNA reagent® (BD) basée sur un marquage à l'iodure de propidium (IP). L'excitation du fluorochrome est réalisée avec un laser bleu à 488nm. La fenêtre de détection utilisée est le filtre 585 +/- 42nm.

La sélection des populations est réalisée selon la hiérarchisation suivante (53) :

- Graphe taille (SSC sur l'axe des ordonnées) en fonction de la complexité interne (FSC sur l'axe des abscisses) : sélection de la population cellulaire
  - Population ayant un rapport IP A en fonction de IP H = 1 donc avec une même intensité de fluorescence de l'IP dans l'axe du laser et à 90°. Cela permet d'éliminer les éventuels doublets de cellules se présentant accolées devant la source laser.
    - Nombre d'évènements en fonction de l'IP :
      1er pic = Cellules en phase G0/G1 = Phase de quiescence
      2nd pic = Cellules en phase G2/M = Phase tardive de division
      Evénements entre les 2 pics : Phase S
      Evénements avant le 1er pic : SubG0 (généralement apoptose)

Le nombre de cellules en phase de division est représenté par le second pic (cellules en phase G2/M). Il s'agit du nombre de cellules en phase active de division. La proportion de cellules en phase G2/M est donc le critère que nous suivons pour estimer l'inhibition du cycle cellulaire et la réactivation du cycle.

Pour exemple, les graphiques de la figure 13 montrent les résultats obtenus en CMF pour la lignée KG1 après exposition à la DFO 200 µmol/L pendant 24h puis à la Fe-Tf 20 nmol/L pendant 24h. Cette expérience montre pour cette lignée 12.8% de cellules en phase G2/M à l'état basal contre 3.2% et 11.2% après DFO et après transferrine respectivement.

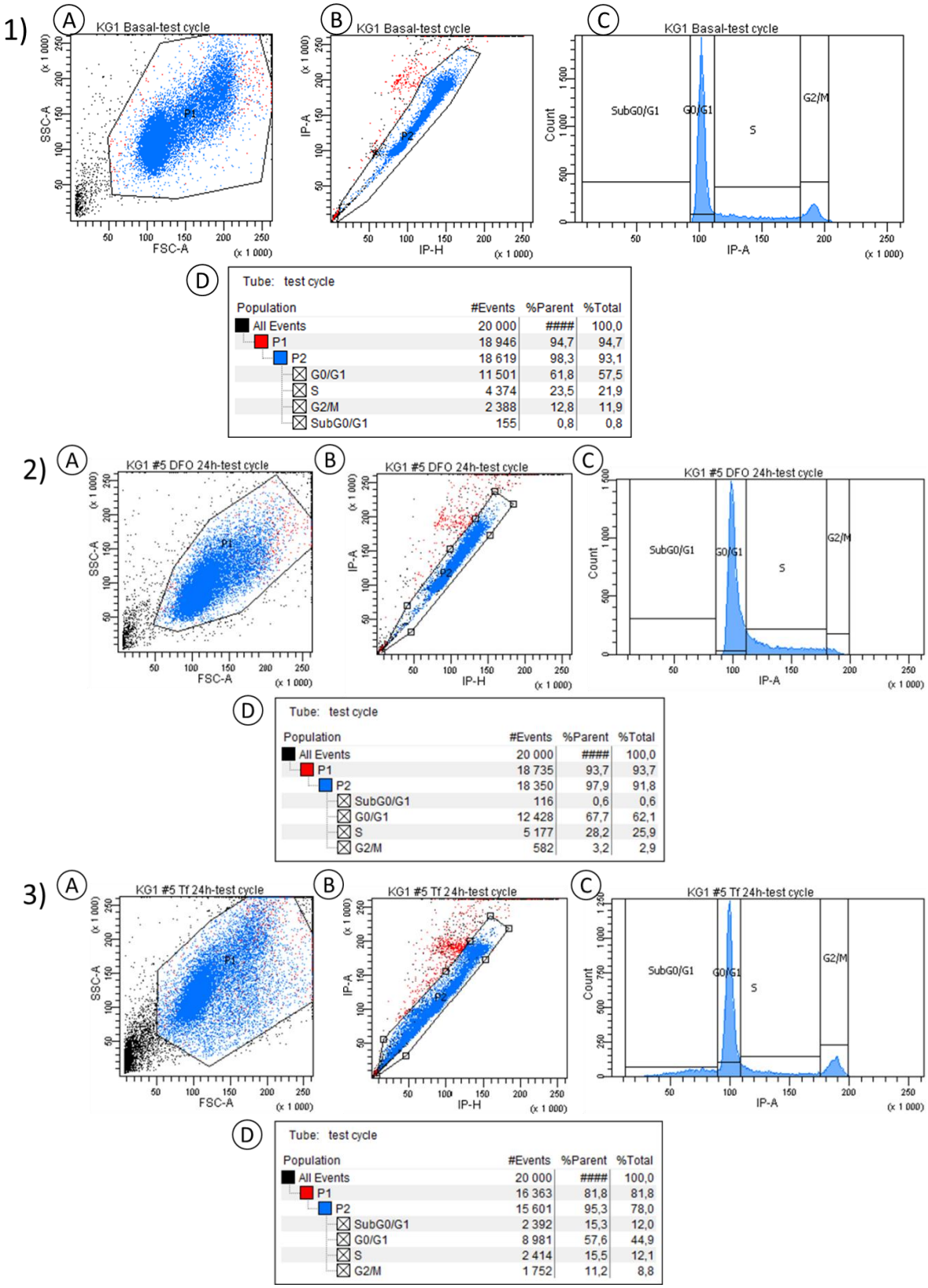


Figure 13 : Exemple des résultats obtenus en CMF pour la lignée KG1.

Les graphiques 1), 2) et 3) correspondent aux étapes du protocole de chélation du fer, respectivement état basal, après déferoxamine et après transferrine. Les graphiques en A correspondent à la population de CSH parmi tous les évènements mesurés en CMF. B correspond aux évènements de A ayant un rapport IP-A sur IP-H = 1. C permet la séparation de la population de B selon l'intensité de fluorescence. Ainsi, le 1er pic correspond aux cellules en phase de quiescence, le 2nd pic aux cellules en phase tardive de division et les cellules entre les deux pics correspondent aux phases précoces de division cellulaire. D représente la hiérarchie des différentes populations.

3.2 Echantillons de patients atteints de LAM

3.2.1 Sélection des échantillons de patients

Les échantillons proviennent de ponction de moelle osseuse de patients diagnostiqués pour une LAM au CHU Grenoble Alpes et au CH Annecy Genevois entre juillet 2017 et avril 2019. Les culots cellulaires ont été récoltés après isolement des cellules mononuclées par technique « ficoll ». Ceux-ci ont été stockés sous la responsabilité du centre de ressources biologiques du CHUGA. Seuls les patients pour lesquels un échantillon de 4M à 15M de cellules ont été retenus, ce qui correspond à 53 échantillons de patients. Les culots cellulaires de moelle de 9 de ces patients n'étaient plus disponibles selon les critères que nous avions établis Le consentement éclairé de 25 patients a été obtenu (incluant les patients décédés pour lesquels le consentement n'a pas été recherché).

Nous avons au final sélectionné 25 échantillons médullaires de patients (figure 14)

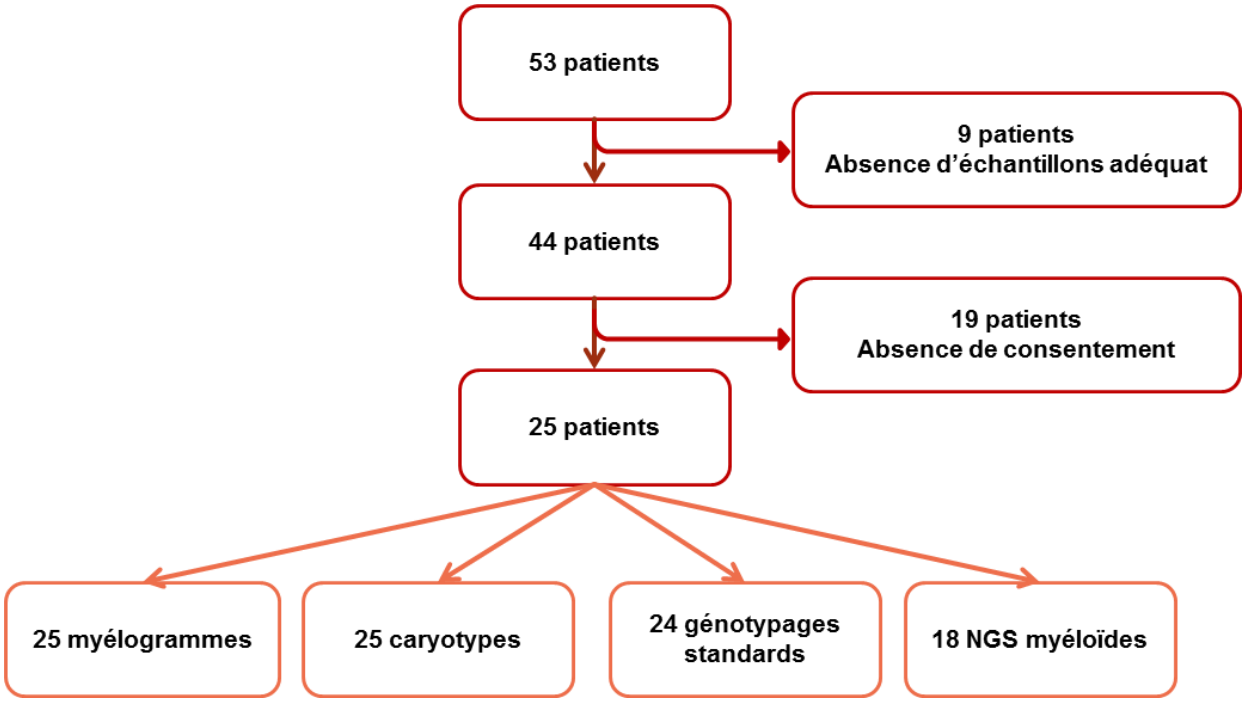


Figure 14 : Mode de sélection des échantillons de patients

3.2.2 Caractéristiques génétiques et phénotypiques des échantillons patients

Les patients sont âgés de 0 à 87 ans (médiane = 60.5 ans) avec un ratio H/F=1.8.

Dans le cadre du diagnostic médical, un caryotype onco-hématologique a été réalisé pour les 25 patients. 24/25 patients ont bénéficié du génotypage des gènes NPM1, IDH1 (R132), IDH2 (R140 et R172) (15), FLT3-ITD (duplication en tandem), FLT3-TKD (D835 ou I836 du domaine tyrosine kinase), CEBPA (7) et 15/25 patients ont bénéficiés de la mesure du niveau d'expression du transcrit WT1 (54) par le laboratoire de génétique des hémopathies du CHUGA (cf figure 14). Ce génotypage est disponible dans un délai court (environ une semaine) et permet d'orienter le traitement par inhibiteurs spécifiques d'IDH et de FLT3. Un génotypage par séquençage de nouvelle génération (NGS) à visée myéloïde a été réalisé pour 18/25 patients par le laboratoire d'hématologie du CHU de Lille (panel des gènes en annexe 1). Cette analyse par NGS, disponible dans un délai plus long (environ 1 mois) permet de préciser le diagnostic et le pronostic moléculaire.

Les diagnostics des patients selon la classification FAB (55) et selon la classification OMS (13) ont été collectés. Selon la classification morphologique FAB : 3 patients étaient atteints d'une LAM1, 5 patients d'une LAM2, 6 patients d'une LAM4, 6 patients d'une LAM 5 et 7 patients d'une LAM avec dysplasie (LAM avec dysplasie multilignée et leucémie myélomonocytaire (LMMC) acutisée). Selon la classification de l'OMS 2016 : 2 patients étaient atteints de LAM sans maturation, 2 de LAM avec maturation, 4 patients de LA myélomonocytaire ou monoblastique, 10 patients de LAM avec mutation NPM1, 1 patient de LAM avec t(8;21) (q22;q22) ; RUNX1-RUNX1T1, 3 LAM associée aux myélodysplasies, 1 syndrome myéloproliferatif à éosinophiles PCM1/JAK2 d'emblée acutisé (entité provisoire de l'OMS). Un patient était atteint de LAM avec t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2At(9;11) et 1 patient avait une LAM avec mutation RUNX1.

Les données des caryotypes (25/25 patients) ont mis en évidence 14 patients sans anomalie cytogénétique (56%). Un patient avait un clone avec une délétion du chromosome Y et une trisomie 8. Trois patients avaient une anomalie 3q dont deux associées à une anomalie 21q et 1 associée à une monosomie 7, le 3ème

patient ayant un clone avec une anomalie 3q associée à une délétion 5q. Un patient avait un clone avec une trisomie 4 et une trisomie 15. Un patient avait un clone avec une monosomie 7 et un autre une délétion 7q. Un patient avait un clone avec une translocation t(5;8), une anomalie 8p et anomalie du chromosome 9 dont l'hybridation par fluorescence in-situ (FISH) JAK2 a montré un réarrangement JAK2. Un patient présentait un clone ayant une anomalie 11q associée à une trisomie 21.

Les données du génotypage IDH1 et 2 (24/25 patients) montraient que trois patients avaient une mutation IDH1 exon 4 c.394C>T:p.R132C, deux patients avaient une mutation IDH1 exon 4 c.395G>A:p.R132H et trois patients avaient une mutation c.419G>A:p.R.140Q. Seize patients n'étaient pas mutés pour les exons des gènes IDH1 et 2 recherchés et aucun échantillon de patient ne portait la mutation IDH R172.

Les données de NGS (18/25 patients) ont montré des mutations DNMT3A chez sept patients (39%). Deux patients portaient une mutation dans l'exon 15 : Un avec c.1786C>T:p.R596W (cooccurrence avec une mutation IDH1) et c.1792C>T:pR598X pour l'autre. Un patient était atteint d'une mutation de l'exon 18 c.2141C>G : p.S714C. Quatre patients présentaient une mutation de l'exon 23 : deux c.2644C>A:p.R882S (dont un patient avec une mutation TET2 concomitante) et 2 c.2645G>A:p.R882H (dont 1 patient avec une mutation TET2 concomitante). Les mutations du gène TET2 ont été retrouvées pour 4 patients (22%), 2 mutations de l'exon 3 chez le même patient : c.2899C>T:p.Q967X et c.3005delC:p.T1002NfsX5. Un patient avec une mutation de l'exon 8 c.4044+2dupT (mutation de splicing) et deux patients avec une mutation de l'exon 11:c.4615delC : p.1539SfsX32 pour l'un et c.4807C>T:p.Q1603X pour l'autre.

Le pronostic génétique selon l'ELN (7) a été établi pour les 25 patients. Sept patients avaient un pronostic favorable, neuf patients un pronostic intermédiaire et neuf patients un pronostic défavorable.

Le niveau d'expression du transcrit WT1 a été également mesuré par RT-QPCR (54) pour 15/25 patients. Le taux de transcrit WT1 est rapporté par rapport au transcrit du gène de ménage ABL. Le transcrit est considéré comme surexprimé

pour un taux > 0.5% dans le sang et 2.5% dans la moelle. Douze patients avaient une surexpression du transcrit WT1 et 3 patients une absence de surexpression de ce transcrit.

Ces données ont été reportées dans le tableau III.

		Patients	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Classification de la pathologie	Classification FAB	LAM1						■				■									■						
		LAM2					■			■			■		■				■								
		LAM4	■								■						■	■				■	■		■	■	
		LAM5		■	■											■							■	■			■
		LAM avec dysplasie				■	■		■					■						■					■	■	
	Classification OMS	LAM sans maturation						■													■						
		LAM avec maturation											■		■												
		LA monocytaire ou monoblastique		■							■											■		■			
		LAM avec mutation NPM1	■				■			■		■				■		■					■		■	■	■
		LAM avec t(8;21)(q22;q22)																	■								
		LAM associée aux myélodysplasies				■			■					■													
		SMP acutisé															■										
		LAM avec t(9;11)(p21.3;q23.3)			■																						
		LAM avec mutation RUNX1																		■							
Cytogénétique	Caryotype (autre que les anomalies classifiantes)	Absence d'anomalie		■			■			■		■				■		■		■	■	■	■		■	■	■
		-Y																						■			
		AN 3q							■		■				■												
		+4																	■								
		del5q				■									■												
		-7 / del7q							■				■	■													
		+8 / AN 8p ou t(5;8)															■							■			
		t(8;21)(q22;q22)																	■								
		del 9q	■																								
		AN 9 (réarrangement JAK2)															■										
		t(9;11)(p21.3;q23.3)			■																						
		AN 11q						■																			
		+15																	■								
		AN 21q							■		■																
		+21						■																			
Statut mutationnel	DNMT3A	exon 15 c.1792C>T																			■						
		exon 15 c.1786C>T																						■			
		exon 18 c.2141C>G	■																								
		exon 23 c.2644C>A																							■	■	
		exon 23 c.2645G>A																■									■
		Sauvage				■		■	■	■		■	■	■	■		■		■	■							
	TET2	exon 3 c.2899C>T																						■			
		exon 3 c.3005delC																						■			
		exon 8 c.4044+2dupT																								■	
		exon 11 c.4615delC																		■							
		exon 11 c.4807C>T	■																								
		Sauvage				■		■	■	■		■	■	■	■		■	■	■		■				■		■
	IDH1	exon 4 c.394C>T		■																	■				■		
		exon 4 c.395G>A								■		■															
		Sauvage	■			■	■	■	■		■		■		■	■	■	■	■	■		■	■	■		■	■
	IDH2	c.419G>A:p.R.140Q					■											■									■
		Sauvage	■	■		■		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■	
Autre	Pronostic ELN	Favorable					■					■							■				■		■	■	■
		Intermédiaire		■	■			■		■	■						■				■	■		■			
		Défavorable	■			■			■				■	■	■	■		■		■							
	Expression WT1	Surexprimé	■			■	■			■			■				■	■	■	■	■				■		■
		Absence de surexpression		■																		■		■			
		Non réalisé			■			■	■		■	■		■	■	■							■			■	

Tableau III : Classifications, caractéristiques cytogénétiques, moléculaire et pronostiques des patients analysés

3.3 Quantification des dérivés de la cytosine par LC-MS/MS

3.3.1 Extraction et digestion de l'ADN

L'extraction et la digestion de l'ADN des lignées cellulaires et des échantillons des patients ont été réalisées selon le protocole du laboratoire suivant. Les cellules sont lysées et lavées avant d'être incubée avec une RNAse (RNAse A, Sigma-Aldrich) et une protéase (Qiagen) afin d'éliminer les ARN ou protéines pouvant interférer avec l'analyse par spectrométrie de masse. L'ADN est ensuite précipité à l'aide d'isopropanol 50% (v/v) et d'Iodure de sodium 22.8 mol/L puis lavé avec de l'isopropanol 40% (v/v) puis de l'éthanol 70% (v/v). L'ADN ainsi extrait est conservé avec ajout de déféroxamine 0.1mmol/L (Sigma-Aldrich) pour limiter les lésions oxydatives induites par le fer résiduel.

Suite à l'extraction, l'ADN est ensuite digéré à l'aide de la phosphodiestérase II à 0.45 U/mL (Sigma-Aldrich), d'une DNAse II à 45 U/mL (Sigma-Aldrich) et d'une nucléase P1 à 9 U/mL (Sigma-Aldrich) qui ont pour but de couper les liaisons phosphodiester pour transformer l'ADN en nucléotide. Ces nucléotides sont ensuite digérés par une phosphatase alcaline 3.4 U/mL (Sigma-Aldrich) pour générer les désoxyribonucléosides. Cette solution est lyophilisée pour éliminer toute interférence de l'éthanol sur la séparation par chromatographie.

Ce protocole maison permet de limiter les lésions d'oxydation de l'ADN pouvant être induites par des trousses commerciales.

3.3.1 Quantification des dérivés de la cytosine

Les échantillons sont analysés par chromatographie liquide ultra performante couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UPLC-MS/MS) (26). Le spectromètre de masse utilisé est un QTRAP 6500® (Sciex) et la chromatographie liquide ultra performante est une EXion LC® (Sciex). La colonne UPLC est composée de silice greffée C18 avec une phase mobile composée de formiate d'ammonium 2mmol/L à un débit de 0.2 mL/min.

Les composés quantifiés ainsi que les transitions utilisées sont répertoriés dans le tableau IV. L'ADN des cellules ayant été extrait et digéré, les analytes sont des

désoxyribonucléosides : désoxyCytidine (dCyd), 5-méthyl-2'-déoxyCytidine (5mdCyd) et 5-hydroxyméthyl-2'-déoxyCytidine (5hmdCyd).

Afin de s'affranchir des variations intrinsèques de sensibilité du spectromètre (encrassement du spray ionisant, non linéarité du signal entre les points bas et haut de la gamme de calibration), nous avons utilisé des standards internes marqués isotopiquement. Les solutions de standards internes (SI) isotopiques sont des solutions commerciales (Toronto Research Chemicals).

Les concentrations des analytes ont été établies à partir du rapport entre l'aire sous la courbe de l'analyte et l'aire sous la courbe du SI, rapporté à la formule de la droite de calibration.

Composé	Analyte/Standard interne	Masse Q1 (Da)	Masse Q3 (Da)
Désoxycytidine (dCyd)	dCyd M+1	229	113
	SI dCyd (M+12)	240	119
5-Methyl-2'-déoxycytidine (5mdCyd)	5mdCyd	242	126
	SI 5mdCyd (M+3)	245	129
5-Hydroxymethyl-2'-déoxycytidine (5hmdCyd)	5hmdCyd-1	258	142
	5hmdCyd-2	258	124
	5hmdCyd (M+3)	261	145

Tableau IV : Transitions utilisées pour chacun des analytes et standards internes. La dCyd a été quantifiée à partir de la transition dCyd (M+1) afin que le signal de l'analyte soit du même ordre de grandeur que le signal du standard interne. Pour la 5hmdCyd, il existe 2 produits de fragmentation différents (5hmdCyd-1 et 5hmdCyd-2) mais seul l'ion fils majoritaire 5hmdCyd-1 a été utilisé pour la quantification. La présence de l'ion fils minoritaire a été vérifiée pour s'assurer de la spécificité du dosage.

Afin d'exprimer les résultats sous le même format que celui utilisé dans la littérature, les taux de dérivés de cytosine sont exprimés sous forme de pourcentage du dérivé par rapport à la cytosine.

La gamme de calibration a été réalisée à partir de dilutions de solutions commerciales que nous avons calibrées par absorption UV à l'aide d'un Nanodrop®. Les points de gammes utilisés sont répertoriés dans le tableau V.

Analyte	dCyd	5mdCyd	5hmdCyd
Point 1 (µM)	0	0	0
Point 2 (µM)	40	2.5	0.002
Point 3 (µM)	80	5	0.005
Point 4 (µM)	160	10	0.01
Point 5 (µM)	320	15	0.02
Point 6 (µM)	480	20	0.04

Tableau V : points de gamme utilisés pour chacun des analytes

Pour limiter les interférences, les gammes de calibrations des différents nucléosides ont été préparées et analysées dans des solutions différentes. Ainsi, chacune des solutions n'est composée que d'un analyte et de son standard interne. Chacun des points ont été passés en triplicata.

Les droites de calibration ont les formules et coefficients de corrélation suivants (Annexe 2) :

- Gamme dCyd (M+1) : $y = 0,0588x + 0,0511$, $R^2 = 0,9997$
- Gamme 5mdCyd : $y = 0,9968x$, $R^2 = 0,9883$
- Gamme 5hmdCyd : $y = 0,1709x$, $R^2 = 0,9987$

3.3.2 Validation de méthode

Pour valider la méthode d'analyse par UPLC-MS/MS, nous avons étudié la répétabilité et la reproductibilité sur la lignée KG1.

L'étude de répétabilité a été faite sur 12 échantillons de 5M de cellules dosés dans la même série d'analyses. L'étude de reproductibilité a été réalisée sur 4 culots cellulaires, échantillonnés à des jours différents et quantifiés à des jours différents. Les résultats sont répertoriés dans le tableau VI.

Concernant la 5mdCyd, l'étude de répétabilité a montré un coefficient de variation (CV = écart-type/moyenne) de 3.2% (moyenne = 4.84%, écart-type = 0.16%). L'étude de reproductibilité a montré un CV de reproductibilité de 8.8% (moyenne = 4.38%, écart-type = 0.38%). Ces résultats de CV de répétabilité et de reproductibilité pour la 5mdCyd sont satisfaisants.

Concernant la 5hmdCyd, l'étude de répétabilité a montré un CV de 6.2% (moyenne = 0.0100%, écart-type = 0.00062%) et un CV de productibilité = 14.6% (moyenne = 0.009%, écart-type = 0.001%). Ces résultats de CV de répétabilité et de reproductibilité pour la 5hmdCyd sont également satisfaisants.

Composé		5mdCyd/dCyd	5hmdCyd/dCyd
Répétabilité (n=12)	Moyenne	4.84%	0.010%
	Ecart-type	0.16%	0.001%
	CV	**3.2%**	**6.2%**
Reproductibilité (n=4)	Moyenne	4.38%	0.009%
	Ecart-type	0.38%	0.001%
	CV	**8.8%**	**14.6%**

Tableau VI : résultats de répétabilité et reproductibilité des dosages de 5mdCyd et 5hmdCyd

Dans un objectif de simplification, nous parlerons dans le reste du manuscrit de dosage de 5mC pour désigner la 5mdCyd, 5hmC pour désigner la 5hmdCyd.

La figure 15 montre des exemples de chromatogrammes.

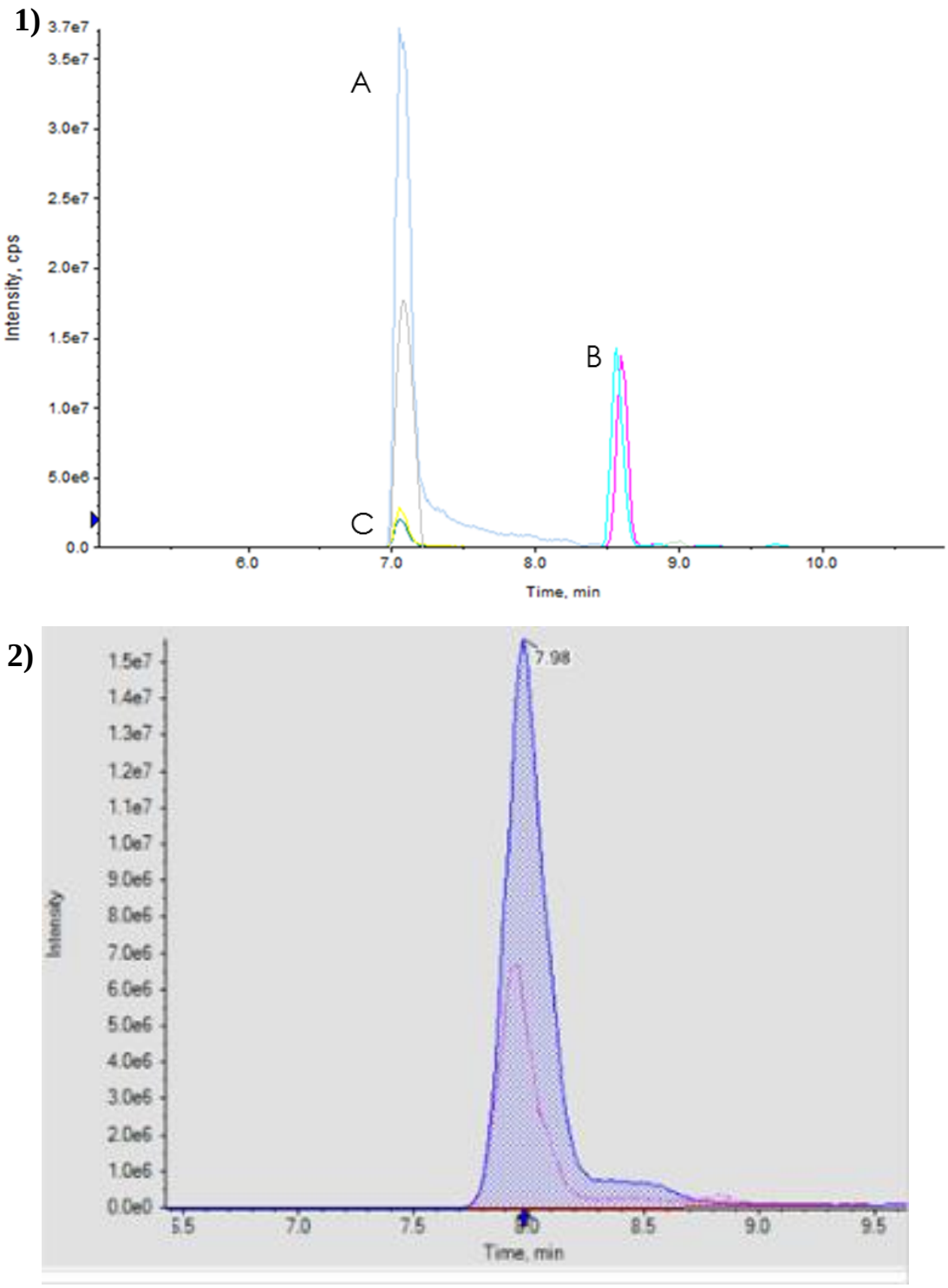


Figure 15 : Exemple de signal du spectromètre de masse pour la figure **1** : la mesure de **A)** dCyd (bleu) et son standard interne dCyd (m+12) (gris), **B)** 5mdCyd (turquoise) et son standard interne 5mdCyd (m+3) (violet), **C)** 5hmdCyd (jaune) et son standard interne 5hmdCyd (m+3) et pour la figure **2** : quantification de la 5mdCyd (aire sous la courbe du pic bleu) par rapport à son standard interne 5mdCyd (m+3) en rose.

4. Résultats

4.1 Optimisation des conditions de culture et impact sur le cycle cellulaire de la chélation en fer

Pour déterminer les doses optimales de chélateur induisant l'arrêt du cycle cellulaire dans les lignées leucémiques, nous les avons cultivés avec des concentrations croissantes en déferoxamine à des temps d'incubation différents. Le tableau VII montre les conditions expérimentales ayant induit un blocage du cycle cellulaire après ajout de déferoxamine, puis une relance du cycle cellulaire après ajout de transferrine.

Lignée	Deferoxamine	Fe-Transferrine
KG-1	200 µmol/L / 24h	20 nmol/L / 24h
HL-60	200 µmol/L / 24h	20 nmol/L / 24h
K562	400 µmol/L / 48h	20 nmol/L / 24h
HEL	400 µmol/L / 24h	20 nmol/L / 48h
OCI-AML3	200 µmol/L / 24h	20 nmol/L / 24h

Tableau VII : Concentrations et temps d'incubation de la DFO et de la Tf ayant provoqué un blocage puis une relance du cycle cellulaire pour les différentes lignées.

Nous observons entre les lignées des différences des concentrations et temps d'incubation nécessaires en DFO pour bloquer le cycle cellulaire. Il est intéressant de noter qu'il faut une exposition plus importante des cellules K562 et HEL pour obtenir l'effet voulu.

Les mesures du cycle cellulaire et la numération des cellules ont été faites à chaque étape du protocole de chélation du fer et d'ajout de transferrine.

La figure 16 montre la proportion de cellules en division à l'état basal, après ajout de déferoxamine et après ajout de transferrine dans les conditions décrites dans le tableau X. Ainsi, après ajout de chélateur du fer, la proportion de cellules en phase G2/M semble diminuer fortement. L'ajout de transferrine saturée en fer entraîne une ré-augmentation de ces cellules en phase G2/M à des niveaux équivalents à

l'état basal. Ces résultats sont reproductibles pour les 5 lignées cellulaires utilisées mais ne sont pas significatifs au sein d'une même lignée car le nombre d'échantillons testés est faible (n=2).

De plus, l'incubation avec la déferoxamine induit une forte diminution de la vitesse de doublement de la population. Cependant, après ajout de transferrine saturée en fer, nous n'observons pas de ré-augmentation de la numération cellulaire après 24h d'incubation. Ceci peut être expliqué par le fait que le cycle cellulaire a bien repris après 24h, mais ce délai est insuffisant pour que la numération cellulaire revienne à l'état basal.

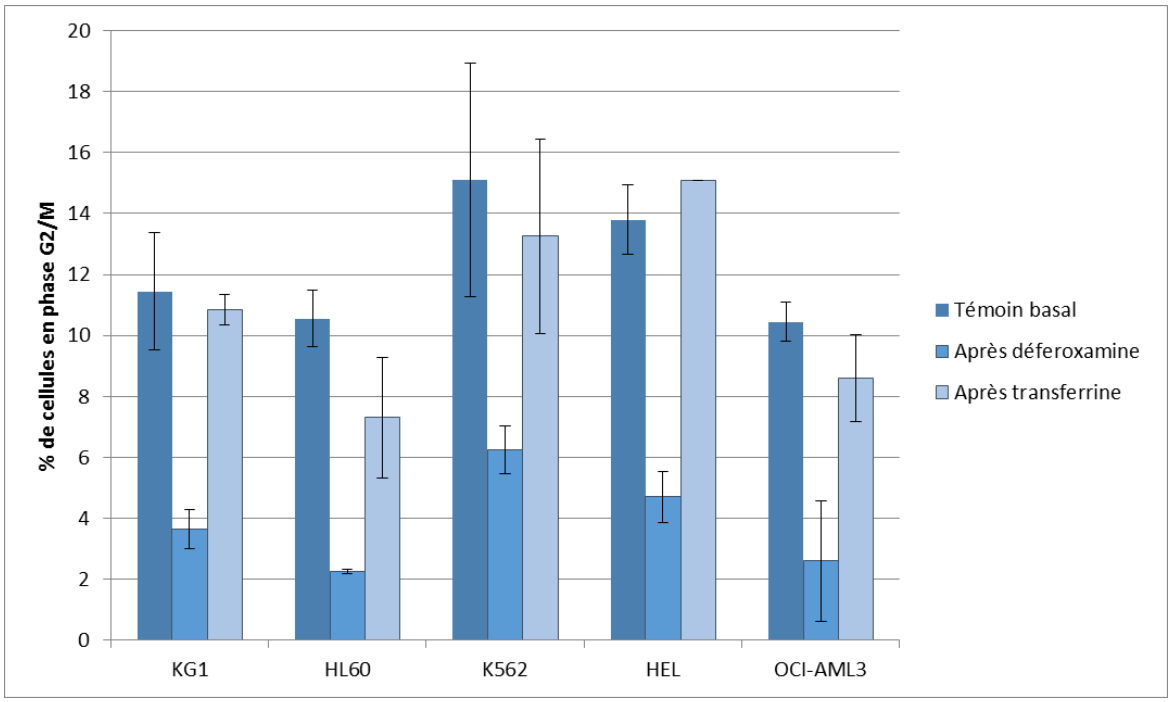


Figure 16 : Proportion de cellules en division dans les différentes conditions du protocole de chélation du fer. n=2, Test statistique de Kruskal-Wallis, p=0.05. On n'observe pas de différence significative pour chacune des lignées entre le témoin basal, après déferoxamine et après transferrine.
KG1, HL60 et OCI-AML3 ont été incubées pendant 24h avec la DFO à 200µM et 24h avec la Tf 20nM. K562 a été incubée pendant avec la DFO pendant 48h à 400µM puis avec la Tf pendant 24h à 20nM. HEL a été incubée avec la DFO à 400µM pendant 24h puis avec la Tf pendant 48h à 20nM.

Les mécanismes de blocage du cycle cellulaire puis d'entrée en apoptose par utilisation de chélateurs du fer sur des cellules tumorales sont bien décrits dans la littérature. En effet, la privation en fer par les chélateurs va induire un blocage de l'activité de la ribonucléotide réductase qui utilise le fer et dont le rôle est de

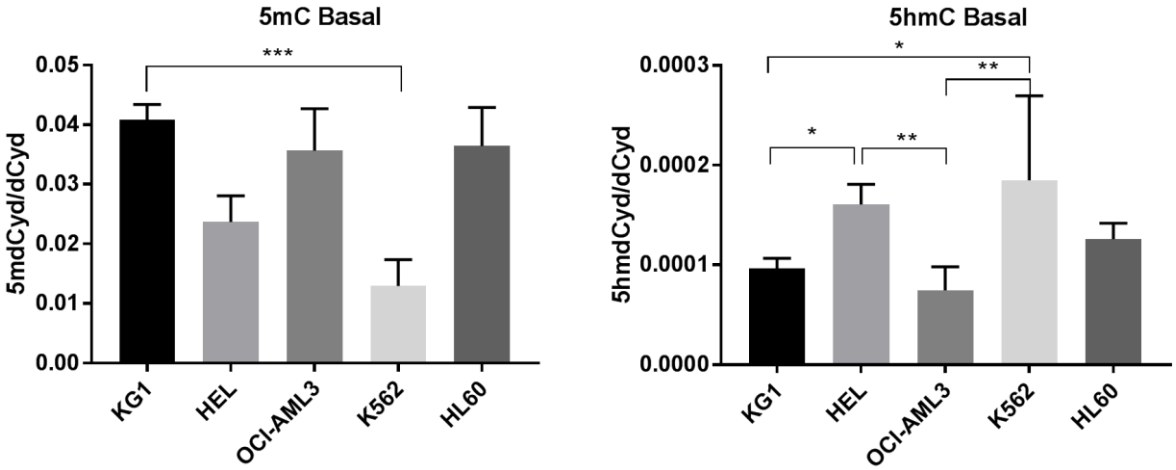
convertir les ribonucléotides en désoxyribonucléotides (56). Lors de la réintroduction de fer sous forme de transferrine saturée en fer, la cellule va capter ce fer à l'aide de ses TfR et ainsi le rendre à nouveau disponible pour entrer en division cellulaire. Cette diminution du pourcentage de cellules en phase G2/M après introduction de DFO et cette ré-augmentation du pourcentage de cellules en phase G2/M sont décrites dans la littérature avec des taux comparables à ceux que nous avons obtenus (48).

Nous observons que les doses et les temps d'incubation de déféroxamine nécessaires pour induire un blocage du cycle cellulaire sont différents selon les lignées. De plus, les doses de transferrine saturée en fer entraînant une reprise du cycle cellulaire, sont différentes pour la lignée HEL.

4.2 Quantification des dérivés de la cytosine

4.2.1 Taux de base dans les lignées cellulaires

Les taux de base de 5mC et 5hmC des lignées cellulaires cultivées en milieu standard sont reportés dans la figure 17.



Lignée cellulaire	Résultats	
	5mC	5hmC
KG1	4.6% ± 0.5%	0.009% ± 0.002%
HEL	2.8% ± 0.1%	0.016% ± 0.002%
OCI-AML3	3.6% ± 0.6%	0.008% ± 0.003%
K562	1.6% ± 0.4%	0.023% ± 0.012%
HL60	3.9% ± 0.2%	0.012% ± 0.001%

Figure 17 : Taux de 5mC et 5hmC des lignées cellulaires à l'état basal illustrés A) sous forme de graphique, B) sous forme de tableaux. Test statistique de Kruskal-Wallis, p=0.05. n=4 pour HL60, K562, HEL, OCI-AML3. n=14 pour KG1.

Variation significative au seuil : * p<0.05 ; ** p<0.01 ; *** p<0.0001

Concernant la 5mC, KG1 est la lignée pour laquelle on observe le taux de méthylation le plus élevé (4.6%). HL60 et OCI-AML3 ont également des taux élevés (respectivement 3.9% et 3.6%), proches de ceux de KG1. Les lignées HEL et K562 ont des taux plus faibles (respectivement 2.8% et 1.6%). Les différences sont statistiquement significatives entre les lignées KG1 et K562 (p<0.0001). .

Concernant la 5hmC, on observe des différences significatives entre les taux de base des lignées : KG1 et K562 (respectivement 0.009% et 0.023%, p<0.05), KG1

et HEL (respectivement 0.009% et 0.016%, $p<0.05$), HEL et OCI-AML3 (respectivement 0.016% et 0.008%, $p<0.01$), K562 et OCI-AML3 (respectivement 0.023% et 0.008%, $p<0.01$). Ainsi, K562 et HEL ont des valeurs de 5hmC supérieures à OCI-AML3 et KG1. HL60 a des taux de 5hmC intermédiaires.

Les taux de 5mC et de 5hmC à l'état basal sont différents selon les lignées étudiées et semblent inversement proportionnels.

4.2.3 Impact d'un agent hypométhylant sur les taux de dérivés de la cytosine dans les lignées cellulaires

Afin de valider la capacité de notre méthode analytique à mesurer une variation de méthylation et d'hydroxyméthylation de l'ADN, nous avons exposé les lignées KG1 et OCI-AML3 à un agent hypométhylant : l'azacitidine. En effet, l'azacitidine porte un atome d'azote en position 5 de la pyrimidine, qui va, après incorporation à l'ADN, par liaison covalente aux DNMT, inhiber de façon irréversible leurs fonctions enzymatiques (40). De plus, il est décrit que l'azacitidine entraine une forte hypo-méthylation de l'ADN.

On observe une tendance à la diminution du taux de 5mC lors de l'exposition à la 5-azacitidine par rapport à l'état basal (respectivement 2.6% contre 4.6% pour KG1 et respectivement 2.3% contre 3.4% pour OCI-AML3) et une tendance à l'augmentation du taux de 5hmC (respectivement 0.045% contre 0.160% pour KG1 et 0.060% contre 0.009% pour OCI-AML3) (figure 18).

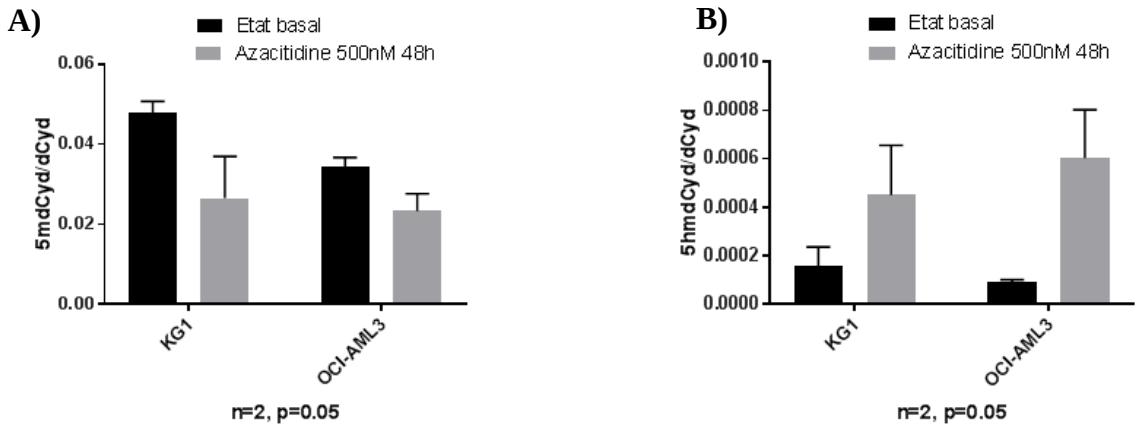


Figure 18 : Taux de A) 5mC et B) 5hmC dans les lignées KG1 et OCI-AML3 avant et après traitement par l'azacitidine 500 nmol/L pendant 48h.

L'azacitidine semble induire une hypométhylation et une hyperhydroxylation de l'ADN, que nous sommes capable de quantifier avec notre méthode d'analyse.

4.2.3 Impact du fer sur les taux de dérivés de la cytosine dans les lignées cellulaires

Les taux de dérivés de la cytosine, 5mC et 5hmC ont été mesurés sur les cellules exposées au protocole de chélation du fer dans les conditions décrites dans le tableau dans la partie « 3.1.2 Protocole de chélation du fer ». Chacune des expériences a été réalisée deux fois.

La figure 19 illustre les taux de 5mC selon les lignées pour chacune des conditions du protocole de chélation du fer.

Pour la condition d'incubation en présence de DFO 200 µmol/L pendant 24h, seule la lignée K562 présente une augmentation significative (1.5% pour l'état basal vs 3.1% en présence de DFO). Il semble y avoir une légère augmentation mais non significative pour HEL et OCI-AML 3. Nous n'observons aucune variation des taux globaux de 5mC pour les lignées KG1et HL60.

Pour la condition d'incubation DFO 400 µmol/L pendant 48h, on observe également une augmentation significative des taux de 5mC pour les lignées KG1 (4.3% vs 5.0%), K562 (1.5% vs 2.6%), HEL (2.9% vs 3.8%) et OCI-AML 3 (3.4% vs 4.4%). On montre une tendance à l'augmentation pour la lignée HL60 mais non significative.

Ces expériences laissent supposer d'une part que la réponse à la DFO varie selon le type de lignée cellulaire et d'autre part suggèrent une relation dose dépendante entre le niveau de chélateur et le taux de 5mc. Une faible exposition à la DFO n'induirait pas d'augmentation des niveaux de 5mC tandis qu'une exposition élevée pourrait induire une légère augmentation des taux de 5mC.

Les taux de 5mC lors de la re-supplémention par la transferrine saturée en sont illustrés sur la figure 20.

Pour la lignée K562, on observe une diminution du taux de 5mC (1.4%) proche de l'état basal (1.5%) après re-supplémentation par la Fe-Tf. Il ne semble pas y avoir d'impact sur les taux de 5mC de la re-supplémentation pour les autres lignées.

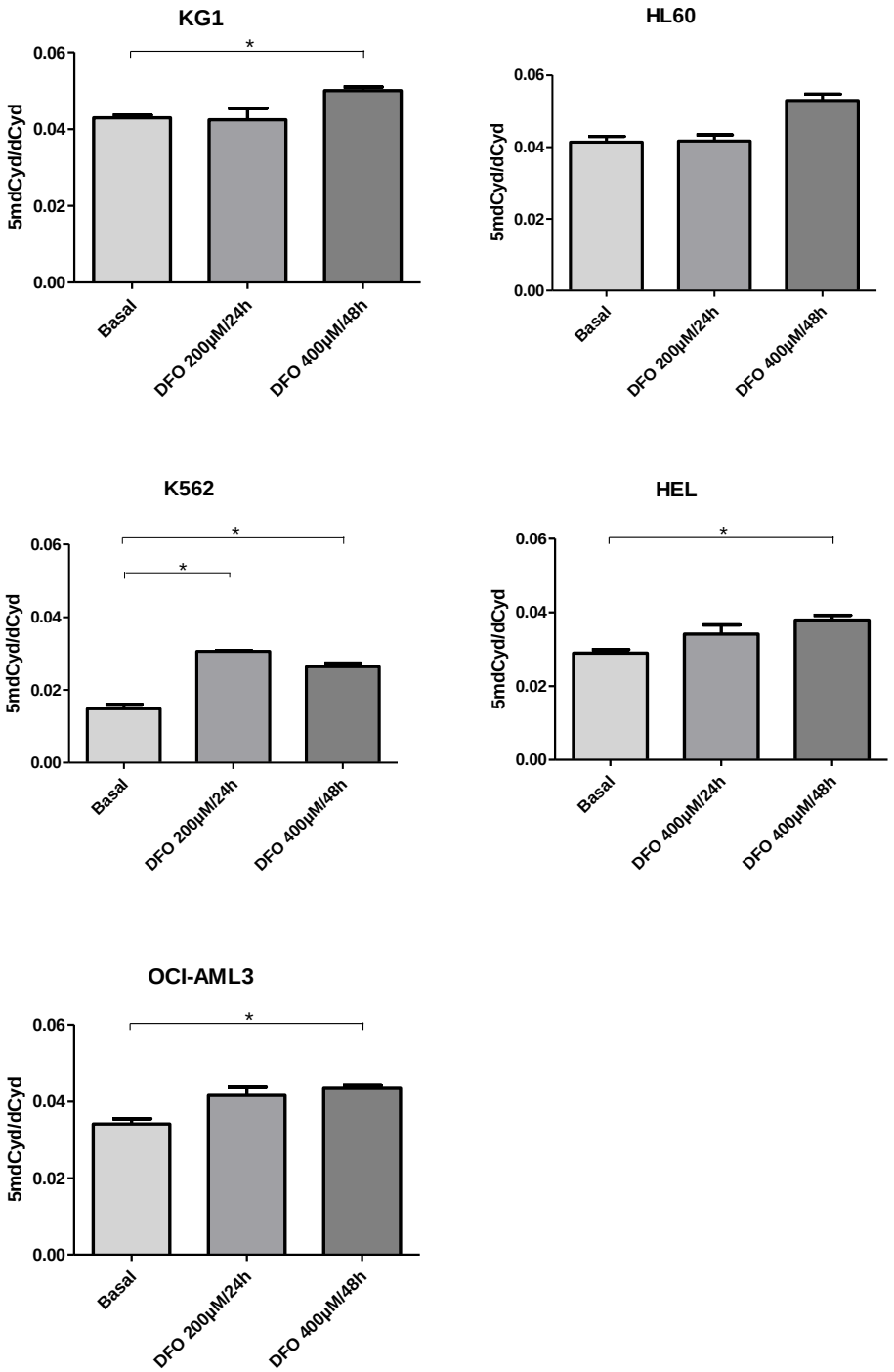


Figure 19 : Taux de 5mC pour chacune des conditions du protocole de chélation du fer dans chacune des lignées (n=16 pour KG1 à l'état basal, n=6 pour HL60, K562, HEL, OCI-AML3 à l'état basal, n=4 par condition d'incubation avec la DFO et par lignée). Test statistique de Kruskal-Wallis (p=0.05).

Variations significatives entre l'état basal et la DFO 400 µM/48h pour KG1, HEL, OCI-AML3 et K562 ($p<0.05$). Variation significative entre l'état basal et la DFO 200 µM/24h pour K562 ($p<0.01$).

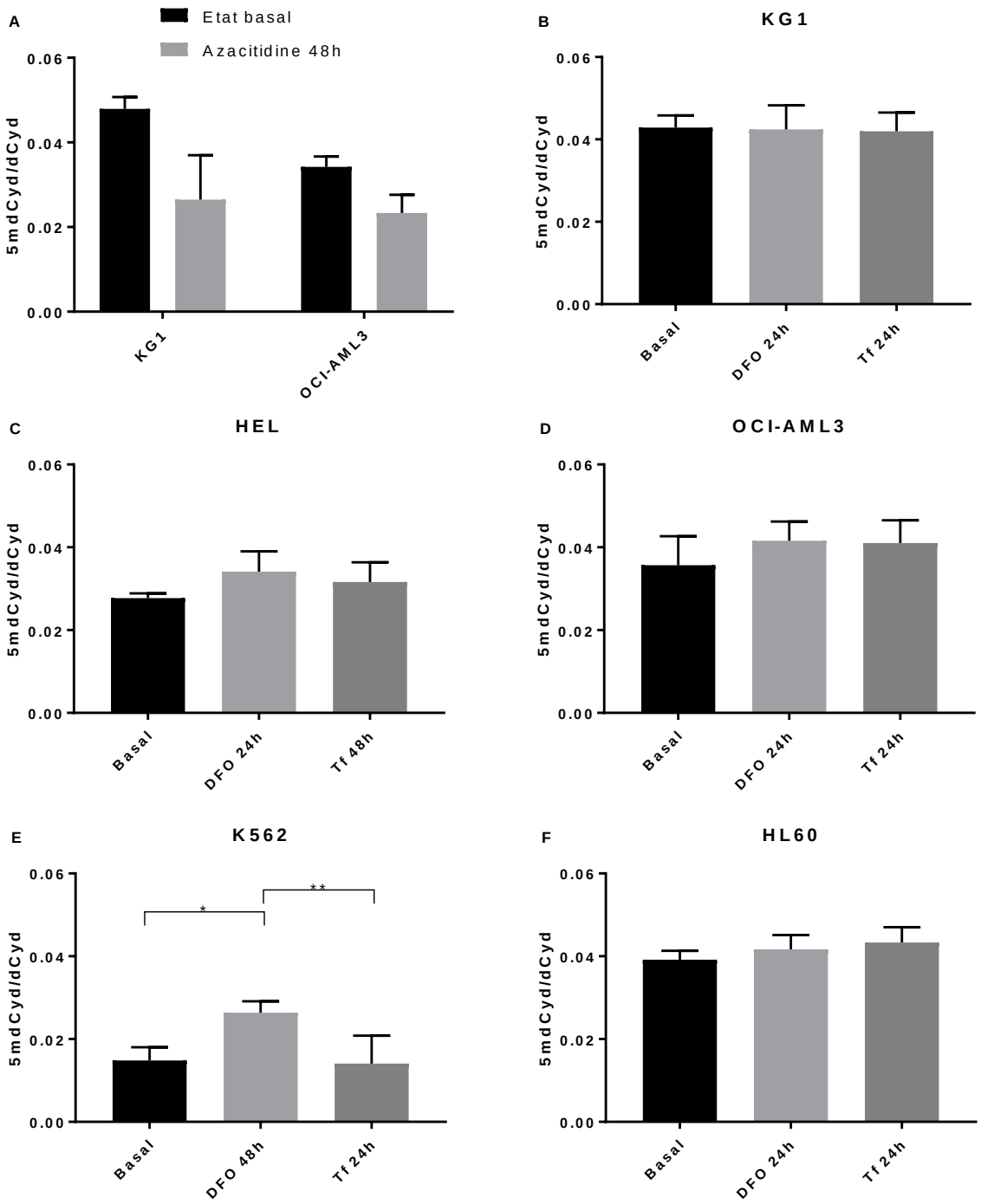


Figure 20 : Taux de 5mC pour A : Expérience témoin des cellules exposées à la 5-azacitidine comparées à l'état basal (n=2). Test statistiques de Mann-Whitney (p=0.05). B. à F : pour chacune des conditions du protocole de chélation du fer dans chacune des lignées (n=4 par condition et par lignée). Test statistique de Kruskal-Wallis (p=0.05).

Variations significatives pour K562 entre DFO 48h et basal ($p<0.05$) et entre DFO 48h et Tf 24h ($p<0.01$).

KG1, HL60 et OCI-AML3 ont été incubées pendant 24h avec la DFO à 200µM et 24h avec la Tf 20nM. K562 a été incubée pendant avec la DFO pendant 48h à 400µM puis avec la Tf pendant 24h à 20nM. HEL a été incubée avec la DFO à 400µM pendant 24h puis avec la Tf pendant 48h à 20nM.

Dans les mêmes conditions expérimentales, nous avons également dosé le taux de 5hmC. La figure 21 illustre les taux de 5hmC selon les lignées pour chacune des conditions du protocole de chélation du fer.

Pour la condition d'incubation en présence de DFO 200 µmol/L pendant 24h, seule la lignée K562 présente une augmentation significative (0.021% pour l'état basal vs 0.036% en présence de DFO). Nous n'observons pas de variation des taux de 5hmC pour les autres lignées cellulaires ou les autres conditions d'incubation.

Après re-supplémentation par la Fe-Tf (figure 22), on observe une diminution des taux de 5hmC pour la lignée K562 (0.016% après re-supplémentation par Tf) mais non significative. Pour la lignée HL60, il semble y avoir une tendance à l'augmentation après re-supplémentation par la Fe-Tf (0.019% par rapport à 0.013%).

Avec faible exposition à la DFO, seule la lignée K562 montre une augmentation des taux de 5mC et de la 5hmC. Avec une forte exposition à la DFO, toutes les lignées semblent avoir une augmentation des taux de 5mC sans variation des taux de 5hmC.

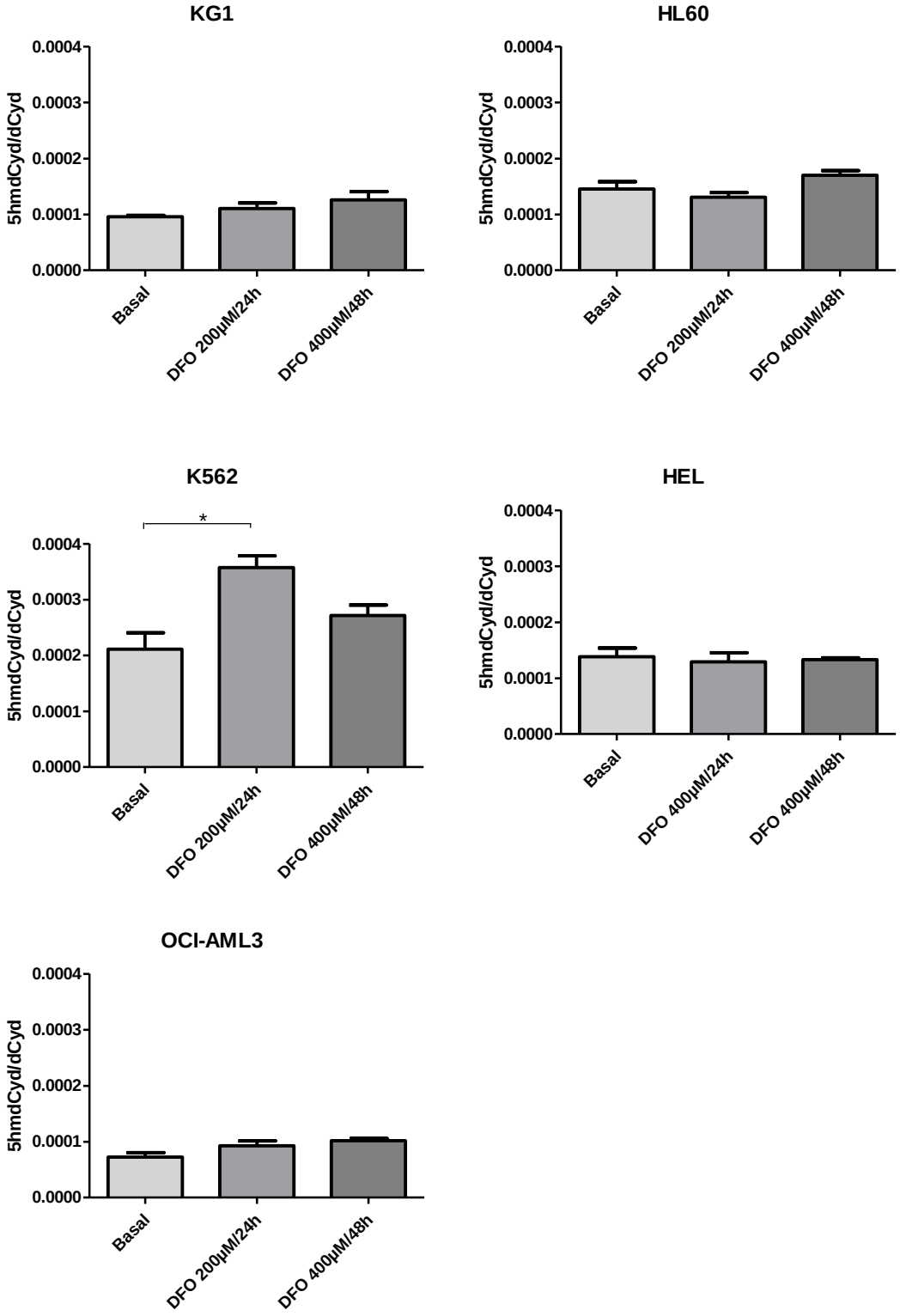
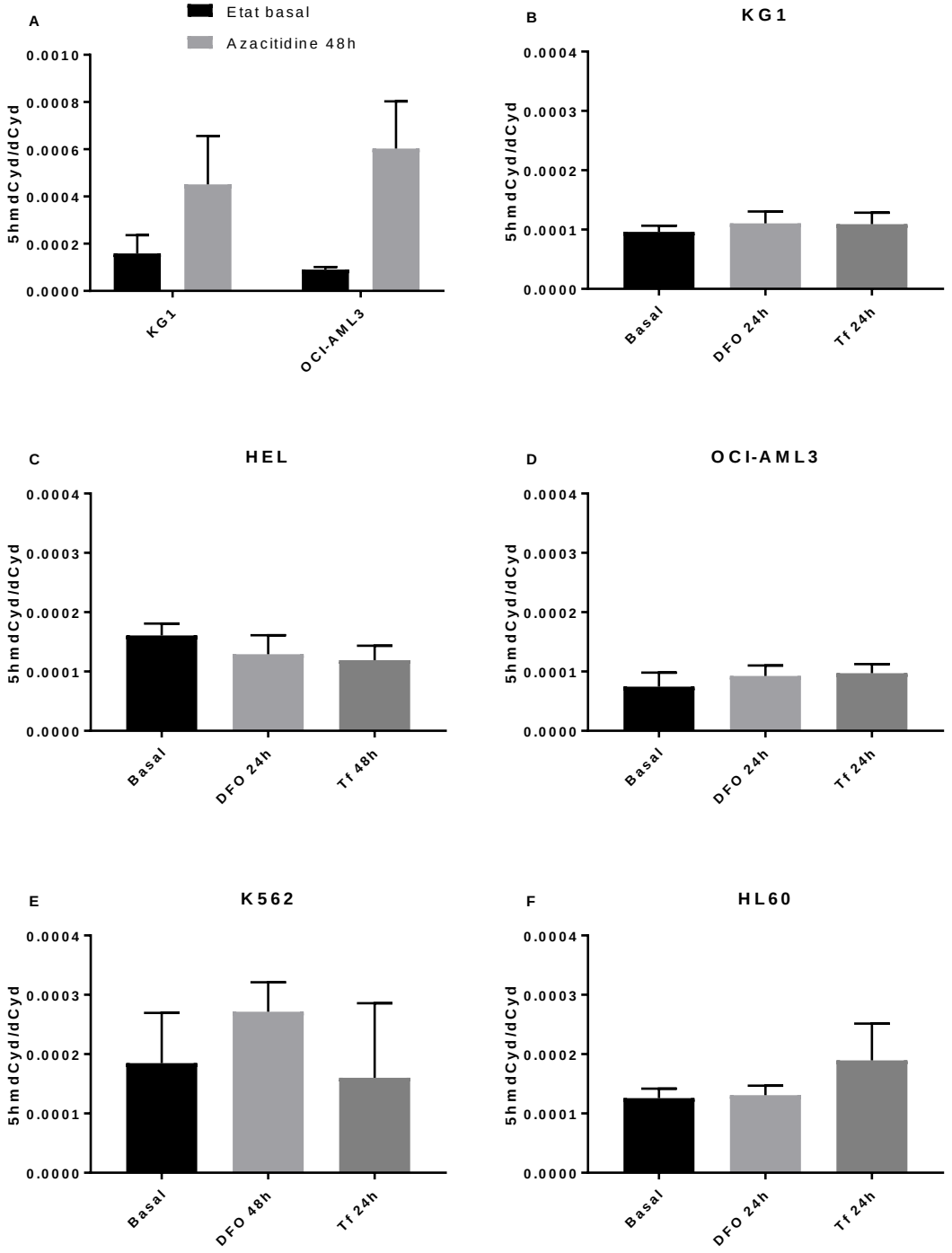


Figure 21 : Taux de 5hmC pour chacune des conditions du protocole de chélation du fer dans chacune des lignées (n=16 pour KG1 à l'état basal, n=6 pour HL60, K562, HEL, OCI-AML3 à l'état basal, n=4 par condition d'incubation avec la DFO et par lignée). Test statistique de Kruskal-Wallis (p=0.05). Variations significatives entre l'état basal et la DFO 200 µM/24h pour K562 (p<0.05).



Figures 22 : Taux de 5hmC pour A : Expérience témoin des cellules exposées à la 5-azacitidine comparées à l'état basal (n=2). Test statistiques de Mann-Whitney (p=0.05). B. à F : pour chacune des conditions du protocole de chélation du fer dans chacune des lignées (n=4 par condition et par lignée). Test statistique de Kruskal-Wallis (p=0.05). L'échelle des ordonnées est différente entre A. et les autres graphiques pour en faciliter la lecture. KG1, HL60 et OCI-AML3 ont été incubées pendant 24h avec la DFO à 200µM et 24h avec la Tf 20nM. K562 a été incubée pendant avec la DFO pendant 48h à 400µM puis avec la Tf pendant 24h à 20nM. HEL a été incubée avec la DFO à 400µM pendant 24h puis avec la Tf pendant 48h à 20nM.

4.2.3 Taux de dérivés de la cytosine chez les patients atteints de LAM

Les taux de 5mC et de 5hmC ont été mesurés dans les cellules leucémiques de 25 patients atteints de LAM (figure 23) au diagnostic. Ces taux ont été comparés suivant le type de LAM selon la classification morphologique FAB (A et B) et selon la classification de l'OMS 2016 (C et D).

Concernant la 5mC, nous n'observons pas de variation entre les sous-groupes de la classification FAB. La moyenne des taux de 5mC (toute LAM confondue) est de 3.95%. On observe une légère tendance à une hypermétylation de l'ADN lors de LAM avec dysplasie cytologique (FAB) (4.3% lors de LAM avec dysplasie (n=3) par rapport à 3.9% pour les autres types de LAM).

Concernant les dosages de 5hmC, nous n'observons pas de variation significative entre les sous-groupes de la classification FAB malgré une tendance basse des LAM 4 (n=7) et LAM 5 (n=5) et une tendance haute des LAM avec dysplasie (n=3). Avec la classification de l'OMS, les taux de 5hmC des LA monocytaires/monoblastiques (0.057%, n=4) sont significativement inférieurs aux taux de LAM avec mutation NPM1 (0.102%, n=9) ($p<0.05$). Les LA monocytaires/monoblastiques semblent également inférieur aux LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies (0.136%, n=3) mais non significatif.

La moyenne des taux de 5hmC est de 0.121%, ce qui est bien supérieur aux taux de 5hmC retrouvés dans les lignées cellulaires (aux alentours de 0.010%).

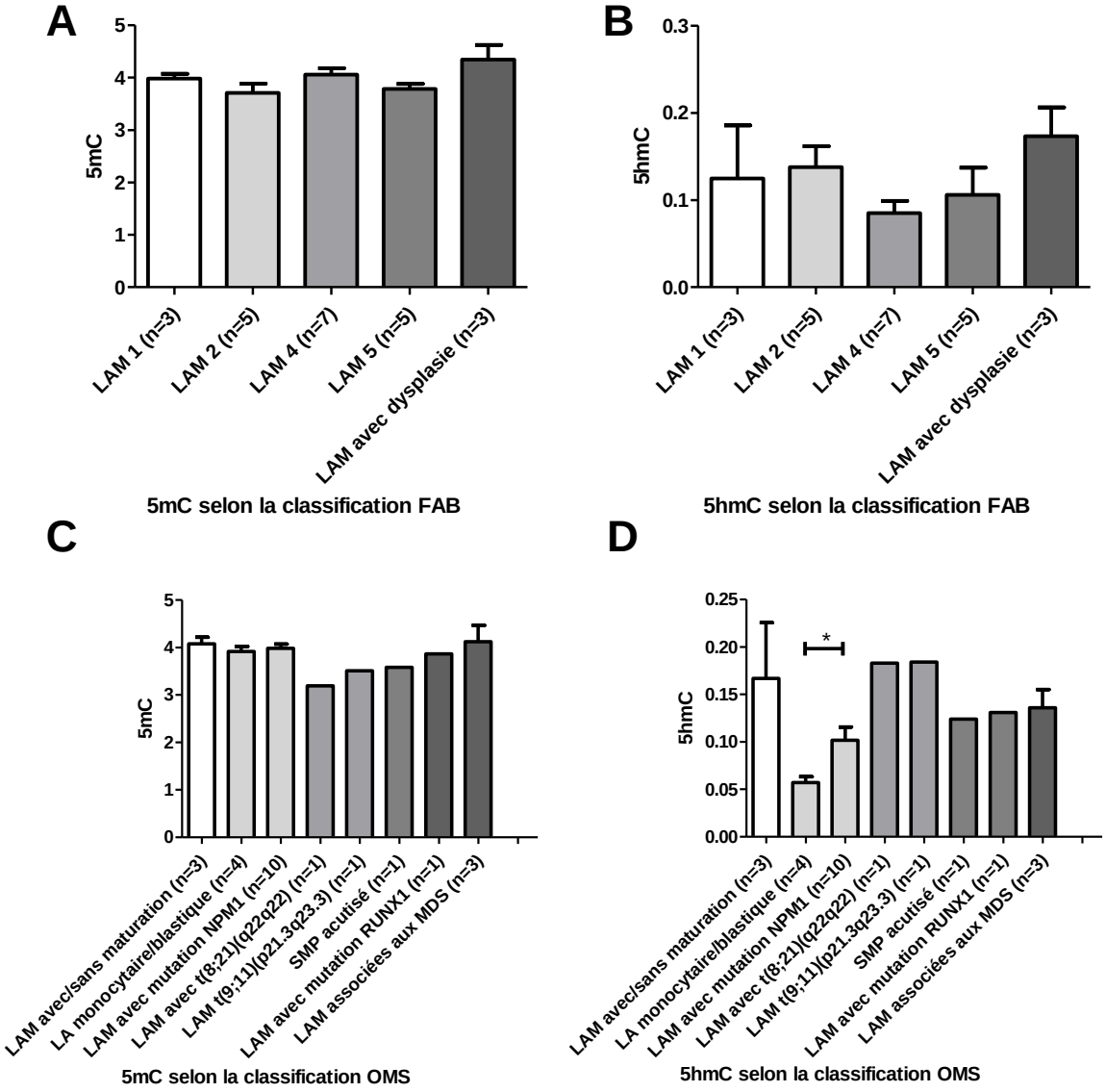


Figure 23 : Taux de 5mC et de 5hmC selon la classification FAB (A et B) et selon l'OMS (C et D. Test statistique de Kruskal-Wallis (p=0.05).

Les taux de 5mC et de 5hmC ont également été comparés selon le statut cytogénétique et les mutations des gènes impliqués dans la méthylation des cytosines. Ainsi, nous avons comparés ces taux de méthylation selon le caryotype (normal par rapport à anormal), le statut mutationnel *DNMT3A, TET2* et *IDH1/2*. Nous avons également comparé le niveau d'expression du gène *WT1*.

Concernant les taux de 5mC (figure 24), on ne semble pas observer de différence selon le statut cytogénétique ou le statut mutationnel.

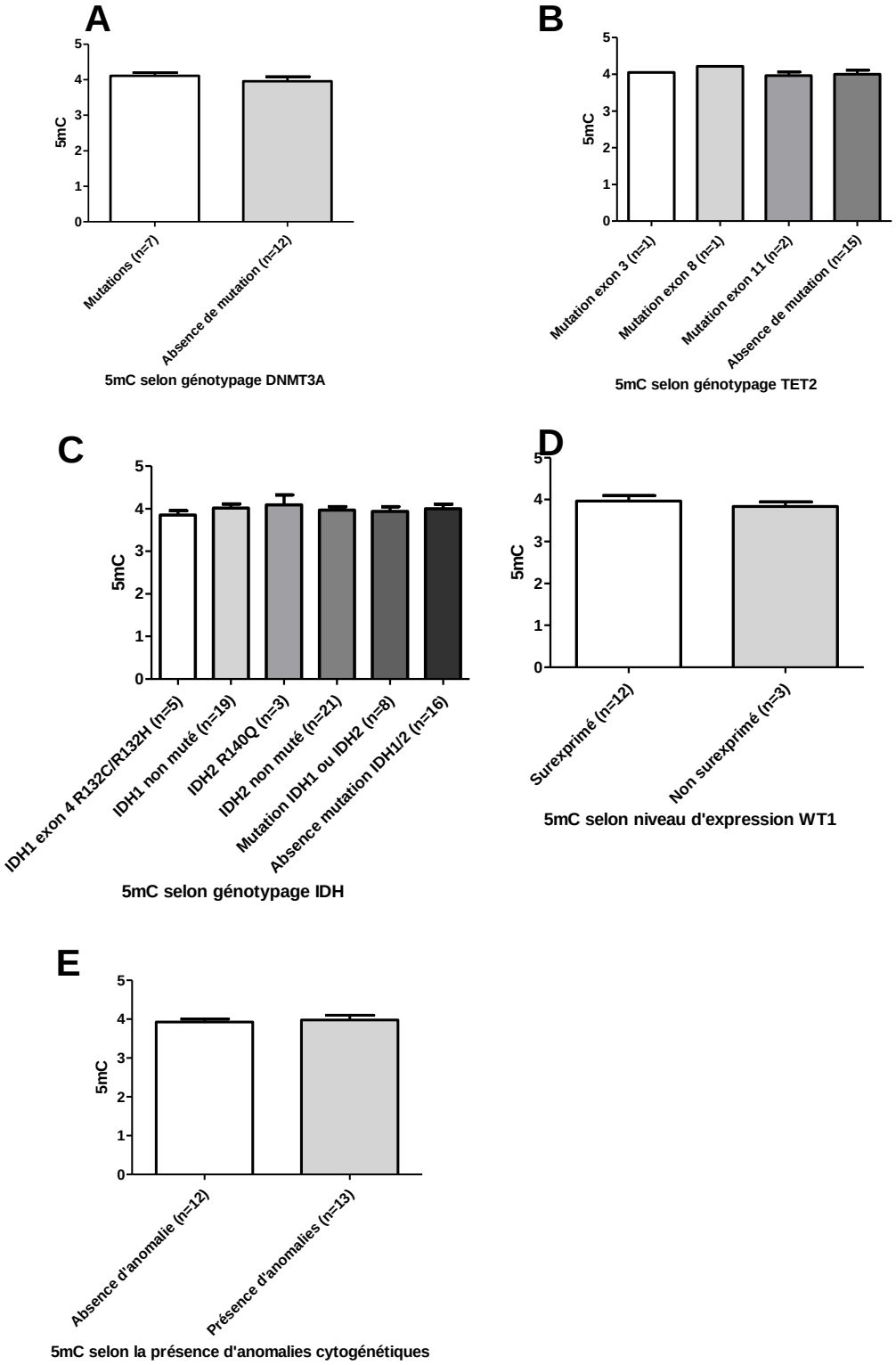


Figure 24 : Taux de 5mC selon le statut mutationnel, **A** : DNMT3A, **B** : TET2, **C** : IDH 1 R132C /R132H et IDH 2 R140Q, **D** : Niveau d'expression WT1 et **E** : statut cytogénétique. Test statistique de Kruskal-Wallis (p=0.05).

Concernant les taux de 5hmC (figure 25), ceux-ci ont été comparés selon la présence ou l'absence d'anomalie cytogénétique décelable. On observe un taux de 5hmC supérieur lorsque caryotype révèle des anomalies (n=12) par rapport à l'absence d'anomalies cytogénétiques (n=13) (0.153% contre 0.084%).

On observe également une diminution significative des taux de 5hmC lorsqu'une mutation du gène DNMT3A est présente (0.074% contre 0.143%). Cette diminution varie selon la mutation observée. Les mutations de l'exon 15 (c.1792C>T:pR598X, n=1 et c.1786C>T:p.R596W, n=1) ainsi que les mutations de l'exon 23 (c.2644C>A:p.R882S, n =2 et c.2645G>A:p.R882H, n=2) ont un taux de 5hmC qui semble inférieur à la mutation de l'exon 18 (c.2141C>G: p.S714C, n=1) (0.062% contre 0.149%).

Les mutations du gène TET2 semblent entrainer une réponse différente sur les taux de 5hmC observés. Les taux de 5hmC des mutations de l'exon 3 (double mutation c.2899C>T et c.3005delC, n=1) et de l'exon 8 (c.4044+2dupT, n=1) semblent inférieur aux échantillons non mutés (0.061% et 0.062% contre 0.122%). Les mutations de l'exon 11 (c.4615delC, n=1 et c.4807C>T, n=1) semblent avoir un taux de 5hmC équivalent aux échantillons sans mutation TET2 (0.140% contre 0.122%).

Les mutations intervenant dans les gènes *IDH1* et *IDH2* induisent un taux significativement inférieur par rapport à l'absence de mutation de l'IDH 1 ou 2 (0.070% contre 0.137%). Les taux observés lors d'une mutation de l'IDH 1 exon 4 R132C/R132H, (n=5) semblent inférieur à ceux retrouvés lorsqu'IDH 1 n'est pas mutés (n=18) (0.070% contre 0.119%). Ces résultats sont similaires à ceux observés pour les mutations du gène IDH 2 R140Q (n=3) par rapport à l'absence de mutation IDH 2 (n= 20) (0.071% contre 0.113%).

Les taux de 5hmC ont également été comparés selon le niveau d'expression de WT1 avec un seuil défini pour une surexpression à 0.5% dans le sang et 2.5% dans la moelle (54). On observe une tendance à l'augmentation du taux de 5hmC lorsque WT1 est surexprimé (n=12) par rapport à l'absence de surexpression de ce transcrit (n=3) (0.117% contre 0.061%).

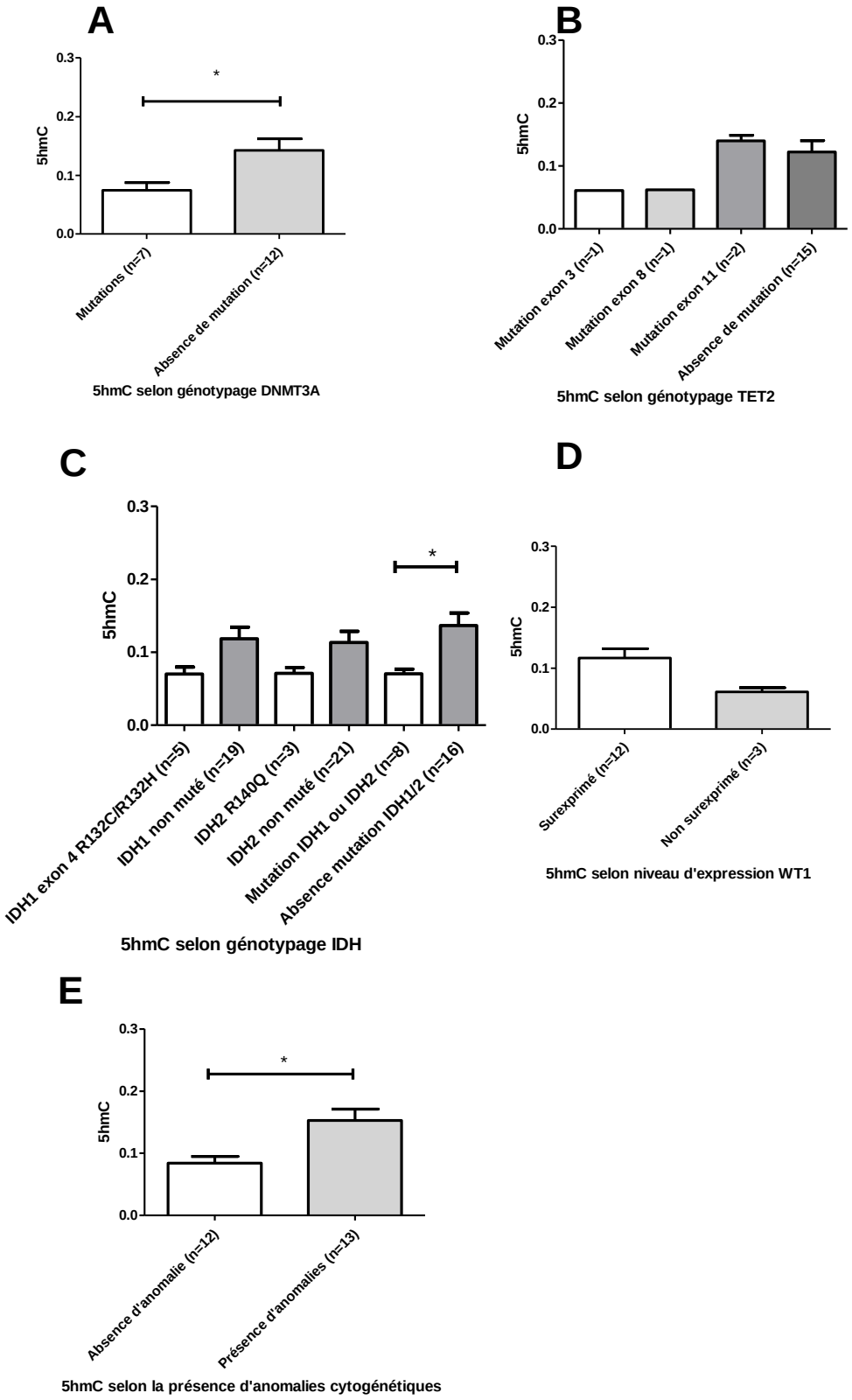


Figure 25 : Taux de 5hmC selon le statut mutationnel, **A** : DNMT3A, **B** : TET2, **C** : IDH 1 R132C /R132H et IDH 2 R140Q, **D** : Niveau d'expression WT1 et **E** : statut cytogénétique. Test statistique de Kruskal-Wallis (p=0.05).

D'une part, les tes taux de 5mC globaux ne semblent pas être différents selon le type de LAM ou le type de mutation observé.
D'autre part, les taux de 5hmC sont plus faible dans les LA monocytaires/monoblastiques et LAM avec mutation NPM1. De plus, on observe des taux de 5hmC plus faible lors d'une mutation DNMT3A, IDH 1/2, lors de l'absence d'anomalie cytogénétique et lors d'une mutation TET2 (mais non significatif).

Relation entre les taux de 5mC, de 5hmC et le pronostic des patients

Les patients ont été classés selon les recommandations de l'ELN en 3 groupes de pronostic différents comprenant respectivement n=8 favorable, n=9 intermédiaire et n=8 défavorables.

La figure 26 montre les niveaux de 5mC et 5hmC dans ces différents sous-groupes.

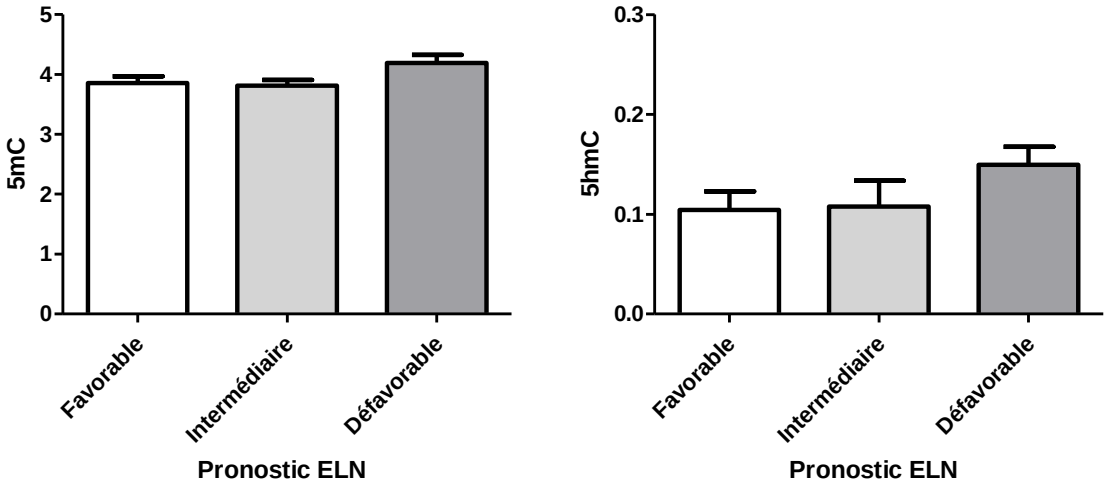


Figure 26 : Taux de 5mC et de 5hmC selon le groupe pronostic de l'ELN (7).

Si les niveaux de 5mC ne semblent pas varier entre ces sous-groupes, nous observons de façon intéressante des variations des taux de 5hmC. En effet, les patients classés dans les groupes pronostics « favorable » et « intermédiaire » ont un taux de 5hmC qui semble inférieur au groupe « défavorable ».

5. Discussion

L'état de méthylation de l'ADN est un élément critique de la régulation de l'expression des gènes et semble particulièrement impliqué dans les LAM. En effet, près de 45% des patients présentent au diagnostic une mutation d'un gène participant à la méthylation ou démétylation des cytosines (23), certaines de ces mutations ayant un impact significatif sur la survie comme dans le cas de DNMT3A chez les patients ayant un pronostic défavorable (33). D'autre part, l'activité de certaines enzymes de régulation du niveau de méthylation de l'ADN sont fer-dépendante (51). Ceci suggère que le fer puisse interférer avec le niveau de méthylation de l'ADN et donc participer à l'initiation et la prolifération du clone leucémique.

Dans ce contexte, nous avons étudié l'impact de la chélation du fer sur le niveau de méthylation de l'ADN dans le modèle de lignées leucémiques et nous avons évalué l'état de méthylation de l'ADN dans un groupe de patient LAM au diagnostic.

Afin de caractériser l'état de méthylation de l'ADN, nous avons tout d'abord mis au point une méthode de dosage de la 5mC mais aussi de sa forme hydroxylée, la 5hmC. En effet il existe très peu de données sur les niveaux de 5hmC dans les LAM (et les cancers de façon globale) bien que les dérivés oxydés de la cytosine contribuent de manière majeure à l'expression des gènes spécifiques aux tissus (28), ce qui en fait une marque épigénétique unique, associée à une transcription active des gènes.

Les taux de 5mC et 5hmC des lignées à l'état basal sont différents

De manière intéressante, nous avons tout d'abord constaté que les niveaux de 5mC et de 5hmC sont très différents selon les lignées leucémiques. On observe que K562 et HEL ont des taux de 5mC plus faibles qu'OCI-AML3, KG1 et HL60. Ces différences de méthylation pourraient être liées au statut moléculaire de la lignée. En effet, la lignée OCI-AML3, qui porte une mutation des gènes *NPM1* et *DNMT3A* R882C semble avoir un taux assez faible de 5hmC. Ces observations sont concordantes avec les résultats obtenus pour les échantillons patients

puisque la présence de mutation NPM1 et DNMT3A semblent toutes les deux associées à des taux de 5hmC plus faibles.

Lorsque l'on compare ces taux à ceux de la littérature (tableau VIII), les taux de KG1 sont supérieurs à ceux qui ont été publiés (4.6% contre 2.5%) (57). On peut expliquer cet écart par le fait que l'équipe de Jiang et collaborateurs n'ont pas utilisé de standards internes isotopiquement marqués. Les taux de K562 et de HL60 (1.6% contre 1.2% et 3.9% contre 5.02%) sont proches de ceux retrouvés dans la littérature (40). De plus, on observe que les taux de 5MC de K562 et HEL sont bas car habituellement, les cellules cancéreuses ont généralement entre 3 et 6% de 5mC (24). De manière globale, les taux que nous avons retrouvés dans les lignées leucémiques (médiane à 3.6%) sont comparables à ceux des cohortes de patients LAM (3.8%) (58).

Lignée cellulaire		Résultats	
		5mC	5hmC
KG1	Notre étude	4.6% ± 0.5%	0.009% ± 0.002%
	Littérature (57)	2.5%	
HEL	Notre étude	2.8% ± 0.1%	0.016% ± 0.002%
OCI-AML3	Notre étude	3.6% ± 0.6%	0.008% ± 0.003%
K562	Notre étude	1.6% ± 0.4%	0.023% ± 0.012%
	Littérature (58)	1.2%	0.024%
HL60	Notre étude	3.9% ± 0.2%	0.012% ± 0.001%
	Littérature (40)	5.02%	0.015%

Tableau VIII : comparaison des taux de 5mC et de 5hmC avec la littérature.

De plus, il est intéressant de noter la tendance de chacune des 5 lignées à avoir un taux de 5hmC inversement proportionnel au taux de 5mC. En effet, il semblerait que plus une lignée possède de 5hmC, moins elle possède de 5mC et inversement. Ceci peut être expliqué par une différence de l'équilibre entre la méthylation et la déméthylation d'une lignée à l'autre. Plus une lignée a une activité TET importante, plus cette enzyme transforme la 5mC en 5hmC puis en 5fC et 5caC pour enfin revenir à la cytosine. Cette tendance ne semble pas avoir été relevée dans la littérature.

L’exposition à l’azacitidine semble induire une hypométhylation et une hyper-hydroxyméthylation de l’ADN

Pour s’assurer que nous pouvons observer des variations des taux de méthylation lors d’un changement de condition de culture cellulaire, nous avons exposé les lignées à l’azacitidine. La diminution du taux de 5mC après exposition à l’agent hypométhylant est un résultat attendu puisqu’il est un inhibiteur des DNMT, enzymes responsables de la méthylation de l’ADN. L’augmentation du taux de 5hmC après exposition à un agent hypométhylant est également décrite dans la littérature. La principale hypothèse expliquant cette observation est que les enzymes TET (responsables de la synthèse de la 5hmC à partir de la 5mC) auraient une activité sélective pour les dinucléotides hémi-méthylés, dont le taux augmente après exposition à l’agent hypométhylant.

Par ces expériences, nous supposons que notre technique de dosage permet l’observation de la variation des taux de 5mC et 5hmC induits par une modification des conditions de culture.

L’exposition des lignées à un chélateur du fer induit une augmentation de la 5mC

La chélation du fer semble avoir un impact sur la méthylation globale de l’ADN. Il est intéressant de noter que les lignées K562 et HEL nécessitent une exposition au fer plus importante pour bloquer le cycle cellulaire. Cela peut s’expliquer par le fait de que ce sont des lignées à composante érythrocytaire et érythroblastique. Ainsi, on peut supposer qu’elles possèdent des réserves en fer plus importante (via l’hémoglobine ?) et des mécanismes d’apport en fer plus performants. En parallèle, la chélation par des doses et temps d’incubation plus faibles semble induire chez K562 une augmentation de la méthylation. On peut se demander si le stress martial induit un ajustement des taux de méthylation de K562 jusqu’au niveau des autres lignées, K562 ayant un faible taux de méthylation de base.

On peut également supposer que les mécanismes de régulation de la méthylation des cytosines fer-dépendants n’agissent pas de manière globale sur l’ADN mais seraient « site dépendant ». En effet, la méthylation et l’hydroxyméthylation des

cytosines ont (entre autre) pour but de réguler l'expression des gènes lorsqu'elles sont impliquées dans les séquences promotrices. On peut donc émettre l'hypothèse que les variations de 5mC et de 5hmC induites par l'exposition à la DFO puis à la Fe-Tf se produisent sur des sites promoteurs spécifiques et non de manière aléatoire sur l'ensemble des cytosines.

Enfin, il serait également intéressant de tester un des autres chélateurs du fer disponible en clinique : le déférasirox et la déféripronе (59) ainsi que de tester la re-supplémentation en fer par une autre source de fer tel que le citrate d'ammonium ferrique (FAC) (60).

Les taux de 5hmC sont différents entre les lignées et les échantillons patients

Lorsque l'on regarde les résultats de 5mC et de 5hmC des échantillons patients, nous observons des taux de 5mC dans le même ordre de grandeur que celui des lignées. A l'inverse et de manière très intéressante, les taux de 5hmC sont très différents entre les mesures des lignées et celles des patients. Les échantillons patients semblent avoir des taux de 5hmC cinq à dix fois supérieurs à celui des lignées, même lorsque des patients semblent porter des caractéristiques proches des lignées leucémiques. Ces taux de 5hmC très bas sur des lignées cellulaires ont également été observés dans la littérature sur des lignées de cancer colorectaux et de cancer du sein (29,61) avec une diminution rapide des taux après 1 semaine de culture, puis qui continuent de diminuer avec le temps. Une étude sur un modèle murin de LAM a également montré des taux de 5hmC très différents, de l'ordre de 0.1% chez la sourie et de 0.01% dans les lignées leucémiques (41).

Nestor et collaborateurs (29) ont montré que ces taux bas sont associés à une perte de l'expression de TET1, TET2 et TET3. Une explication possible est que le processus de culture cellulaire entraînerait des modifications des voies de régulations de l'épigénétique. Les modifications épigénétiques étant des réponses aux variations environnementales, on peut supposer que ces différences avec les lignées cellulaires sont dues au processus artificiel de culture cellulaire in vitro, dont l'environnement est très différent de l'environnement médullaire. Cela rend la

comparaison des taux de 5hmC entre les lignées et les échantillons patients peu interprétable. Il sera également important de déterminer si notre méthode de culture cellulaire est un modèle adéquat pour étudier les variations de 5hmC.

Ces différences semblent logiques puisque la régulation épigénétique et notamment la méthylation des cytosines est une réponse adaptative de l'expression des gènes aux expositions environnementales.

Les taux de 5hmC semblent différents selon le type de LAM et selon le type de mutation

Nous pouvons relever dans la littérature quelques exemples d'études incluant des mesures de 5hmC dans les échantillons de patients. Ainsi, Kroeze et ses collaborateurs (62) ont mesuré les taux de 5hmC dans 206 échantillons de jeunes patients (<60 ans) atteints de LAM. Cette équipe a montré que les patients ayant une mutation TET2 ou une mutation IDH ont des taux de 5hmC significativement diminués et de manière intéressante, les patients avec des taux élevés de 5hmC semblent avoir une survie globale diminuée. On peut noter comme limite de cette étude que cette équipe n'utilisait pas de standard interne marqué isotopiquement. Une autre équipe : Ahn et collaborateurs ont mené une étude chez 375 patients atteints de LAM (63) avec comme objectif de déterminer un lien entre les taux de 5hmC et la survie globale. Ils ont montré que les patients avec mutation TET2 et IDH ont des taux de 5hmC significativement inférieurs mais que ces taux ne seraient pas corrélés à la survie globale. On peut noter comme limite que les dosages ont été effectués par méthode immuno-enzymatique qui est moins sensible et moins spécifique que l'HPLC-MS/MS.

Dans notre étude, lorsque l'on compare les taux de 5mC et 5hmC selon les différents sous-types de LAM, de manière intéressante, nous observons des taux de 5hmC plus élevés pour les patients ayant un caryotype avec anomalie cytogénétique par rapport à ceux sans anomalie. Le nombre de patients est insuffisant pour comparer ces taux au type d'anomalie observée.

On semble observer une légère augmentation des taux de 5hmC lors des LAM avec dysplasie cytologique (selon la classification FAB). Les LAM issus d'une

différentiation monocytaire ont des taux de 5hmC nettement inférieurs aux autres LAM. Les LAM avec mutation NPM1 ont également des taux plus faibles. La lignée OCI-AML3, qui est une LAM avec orientation monocytaire et avec des mutations des gènes *NPM1* et *DNMT3A* semble elle aussi montrer des taux légèrement plus faibles que les autres lignées. On peut donc supposer que la différenciation monocytaire pourrait induire une diminution de l'hydroxyméthylation de l'ADN. Nous observons également que, pour l'échantillon avec réarrangement MLL (t(9;11)(p21.3;q23.3) - MLLT3-KMT2A), les taux de 5hmC sont assez élevé. Cette observation a déjà été relevé dans la littérature (26,36), l'hyper-hydroxyméthylation étant due à la protéine TET1 directement ciblée et activée par MLL.

De plus, on retrouve également ce faible taux de 5hmC pour les patients portant une mutation DNMT3A, tendance que l'on semble observer également pour les patients portant une mutation NPM1. Les taux de 5hmC sont différents selon le type de mutation de DNMT3A observée. Il est intéressant de noter que l'échantillon avec la mutation de l'exon 18 c.2141C>G:p.S714C de DNMT3A semble avoir un taux de 5hmC équivalent aux échantillons sans mutation alors qu'il s'agit d'une mutation faux-sens (64). Une équipe semble suggérer que cette mutation induirait une diminution drastique de la méthylation de l'ADN (33), résultat que nous n'observons pas dans notre étude. De plus, cette mutation semble induire un taux de 5hmC proche de celui des patients non mutés pour DNMT3A. Ceci laisse supposer que cette mutation de l'exon 18 c.2141C>G:p.S714C de DNMT3A n'induirait pas de modification de l'activité enzymatique bien que dans un modèle murin d'induction de l'expression protéique, une perte de l'activité enzymatique de DNMT3A a été décrite (33). Le patient portant cette mutation dans notre étude a également une mutation de TET2, ce qui induit probablement un biais dans l'interprétation de ces taux normaux de 5hmC. Les mutations précédemment citées de l'exon 15 et de l'exon 23 peuvent être, quant à elles associées à une diminution de l'activité enzymatique.

Notre étude comporte également des patients avec des mutations de TET2 dont 1 patient sur 4 a une double mutation, ce qui est décrit comme survenu dans

environ 50% des cas de LAM avec mutation TET2 (35). On observe que des doubles mutations sont associées à une tendance d'hypo-hydroxyméthylation des cytosines. Cela laisse supposer que ces mutations induisent une diminution de l'activité enzymatique de TET2 qui entraînerait une diminution des taux de 5hmC. Ces résultats semblent logiques puisque le rôle de TET2 étant de convertir la 5mC en 5hmC. De plus, une diminution de la 5hmC lors de mutation de TET2 a été décrite dans la littérature (23,38). Cependant, les mutations de l'exon 11 c.4615delC et c.4807C>T ne semblent pas induire de diminution des taux de 5hmC. Ces deux mutations sont des mutations non-sens ce qui laisse supposer que celles-ci n'entraînent pas d'altération du site catalytique. On retrouve dans la littérature une diminution de la 5hmC lors de mutations de TET2 (62), ce qui est concordant avec nos résultats. Cependant cette équipe a quantifié la 5hmC par méthode ELISA, ce qui explique la discordance des taux retrouvés avec notre étude (63).

Concernant les mutations d'IDH1 R132C/R132H et IDH2 R140Q, Figueroa et ses collaborateurs semblent montrer que les mutations IDH1/2 sont associées à une hyperméthylation de l'ADN (33), résultat que nous ne retrouvons pas dans notre étude. Cela peut s'expliquer par le fait que cette équipe a comparé des patients atteints de LAM (avec mutations IDH 1 et 2) par rapport à des cellules souches de patients sains et non des patients atteints de LAM sans mutation IDH 1/2. De plus, cette équipe a mesuré le niveau de méthylation par une autre méthode (immunofluorescence) qui semble moins spécifique que la LC-MS/MS.

Par ailleurs, nous observons des taux de 5hmC significativement abaissés en présence de ces mutations, qui semblent similaires selon la mutation observée. Ces résultats sont concordant avec ce qui a été observé dans la littérature (34,65). Ces mutations sont associées à un gain de fonction, ce qui entraînerait une accumulation de 2-HG qui inhiberait les enzymes α-KG dépendent tel que TET2 par analogie structurale. Cette inhibition de TET2 abouti à la diminution des taux de 5hmC. Il serait également intéressant de mesurer les taux de 5hmC chez les patients atteints de LAM avec des mutations IDH1/2 bénéficiant d'un traitement inhibiteur de l'IDH : l'enasidenib et l'ivosidénib avant et après exposition au traitement.

Lors de notre étude, nous avons également observé l'impact de la surexpression du gène WT1. En effet, il a été décrit une diminution des taux de 5hmC lors de mutations du gène WT1 (38), qui entraînerait une diminution de l'activité de TET2 et donc une diminution de la formation de 5hmC. Nous avons donc regardé l'évolution de ces taux lors d'une hyperexpression du transcrit WT1 qui montre une tendance à l'hyperhydroxyméthylation de l'ADN. Ce résultat semble logique car WT1 pourrait augmenter l'activité de TET2 pour former la 5hmC. D'un point de vue physiopathologique, WT1 est exprimé principalement dans les cellules à différenciation granulocytaire. La lignée HL60 surexprime également le transcrit WT1. Les 3/15 patients ne surexprimant pas WT1 sont atteints pour deux patients de LAM 5 et un patient de LAM 4, donc, des LA à orientation monocytaire, ce qui est corrélé aux résultats des faibles taux de 5hmC chez les patients atteints de LA monocytaires et monoblastiques.

Les taux de 5mC globaux ne semblent pas différents selon le type de LAM ou selon le type de mutation

Il est intéressant de noter que quelles que soient les mutations observées, les taux de 5mC restent inchangés, ce qui a également été relevé dans la littérature (23) lorsque le dosage a été réalisé par spectrométrie de masse. Au contraire, il a été observé dans la littérature, lorsque la méthylation est étudié sur puce illumina, une hypométhylation focale lors de la présence d'une mutation du gène *DNMT3A* R882C (66). Notre hypothèse est que des variations ne peuvent pas être observées à cette échelle de méthylation (de l'ordre de 4-5 pour 100 cytosines). Les modifications induites par les mutations des gènes acteurs de la méthylation entraînent des modifications de méthylation plus fines, très majoritairement sur les ilots CpG et non anarchiquement sur l'ensemble des cytosines. Les taux de 5hmC étant bien plus faibles (environ 1 pour 1000 cytosines), il est plus aisé d'observer de petites modifications à l'échelle du génome. Ces résultats sont également en faveur d'un rôle de la 5hmC dans la régulation de l'expression des gènes et pas seulement d'intermédiaire de déméthylation des cytosines.

Relations entre le taux de 5mC, 5hmC et pronostic des patients : utilité comme biomarqueur ?

Plusieurs études ont reliées l'état de méthylation de l'ADN au pronostic des patients. Nous avons donc recherché si des variations significatives de 5mC et/ou 5hmC existaient entre les différents sous-groupes pronostiques de l'ELN (7,62).

Nos résultats montrent une tendance à l'augmentation des taux de 5hmC lorsque le pronostic selon l'ELN est défavorable. Ces taux plus élevés de 5hmC laissent supposer une dérégulation de la méthylation et déméthylation de l'ADN lorsque le pronostic est défavorable, c'est-à-dire que la cellule leucémique est plus agressive avec un potentiel de réplication plus important. On peut également supposer que cette hyperhydroxyméthylation de l'ADN est liée à une diminution focale des taux de 5mC, que l'on ne peut pas observer sur des mesures globales de méthylations.

De cette manière, Figueroa (67) et ses collaborateurs ont montré qu'il existe des modèles de méthylation du génome à grande échelle selon le type de LAM et que ces marques épigénétiques sont associés à une survie différente des patients.

L'étude du méthylome, par la caractérisation de ces signatures épigénétiques pourrait être un facteur pronostic ou de réponse au traitement utilisable en pratique clinique. Ainsi, les mesures de 5mC et de 5hmC pourraient, à terme être utilisées comme biomarqueur pour la prise en charge personnalisée des LAM.

6. Conclusion

THÈSE SOUTENUE PAR SIMON CHEVALIER

TITRE : LA METHYLATION DE L'ADN DANS LES LEUCEMIES AIGUES MYELOBLASTIQUES : IMPACT DE LA CHELATION DU FER ET VALEURS CLINIQUES

CONCLUSION :

Les leucémies aigües myéloblastiques sont des pathologies de mauvais pronostic puisque seulement 28.3% des patients survivent 5 ans après le diagnostic. Des liens étroits entre la survie des patients et le statut mutationnel du clone leucémique impliqué sont bien décrits. Ces mutations concernent entre autre les gènes *TET2, IDH*1 et *IDH2* ainsi que *DNMT3A*. Ces gènes sont impliqués dans la régulation du méthylome qui a pour but de contrôler l'expression des gènes. Il apparait aujourd'hui que la méthylation et l'hydroxyméthylation des cytosines jouent un rôle important dans la leucémogénèse et le potentiel réplicatif du clone tumoral. Part ailleurs, le fer intervenant dans la structure de certaines enzymes impliquées dans la régulation du méthylome suggère qu'il participe à l'extension du clone leucémique.

Ces travaux ont pour objectif d'une part l'évaluation des taux globaux de 5mC et de 5hmC dans des échantillons de patients et dans des lignées cellulaires. Nous comparons ces taux avec le statut mutationnel des gènes impliqués dans la régulation du méthylome chez des patients atteints de LAM. D'autre part, un des objectifs de ces travaux est de rechercher des liens entre le méthylome et la déplétion en fer de lignées leucémiques par ajout de chélateur du fer, puis la re-supplémentation par ajout de transporteur du fer. Les dosages de 5mC et de 5hmC ont été réalisés par UPLC-MS/MS à l'aide de standards internes isotopiques, méthode de dosage sensible, spécifique et reproductible que nous avons mise au point.

Dans un premier temps, nous avons déterminé que les taux de bases de 5mC et de 5hmC sont différents d'une lignée leucémique à l'autre. La privation en fer par

ajout de chélateur semble induire une augmentation de la méthylation de l'ADN avec peu d'impact sur l'hydroxyméthylation. Les doses de chélateurs nécessaires pour induire une modification des niveaux de méthylation semblent différentes selon les lignées.

Dans un second temps, nous observons que les taux de 5hmC sont également différents chez les patients au diagnostic selon le type de LAM avec des taux plus faible lors de mutations des gènes DNMT3A, IDH1/2 (significatif) ainsi que TET2 (non significatif). Ces taux semblent également plus élevés lors de la présence d'une anomalie cytogénétique. De plus et de manière intéressante, nous montrons une tendance à l'hyperhydroxyméthylation de l'ADN lorsque le pronostic est défavorable. Les taux globaux de 5mC ne semblent pas varier selon le type de LAM ou le statut mutationnel.

La caractérisation des signatures épigénétiques du méthylome permettrait une prise en charge personnalisée de ces pathologies, c'est pourquoi l'étude des liens entre épigénétique et LAM doit être approfondie. Les mesures de 5mC et de 5hmC, facilement adaptable en pratique clinique pour les laboratoires de biologie médicale pourraient, à terme être utilisées comme biomarqueurs pronostic ou théranostic des LAM.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Grenoble, le : 26/08/19

LE DOYEN

Pr. Michel SEVE

Pour le Président
et par délégation
Le Doyen de Pharmacie
Pr. Michel SEVE

LE DIRECTEUR DE THESE

Pr. Pascal MOSSUZ

Bibliographie

1. Acute Myeloid Leukemia - Cancer Stat Facts [Internet]. [cited 2019 Jul 18]. Available from: https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html

2. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med. 2015 Sep 17;373(12):1136–52.

3. Shlush LI. Age-related clonal hematopoiesis. Blood. 2018 01;131(5):496–504.

4. Danlos F-X, Papo M, Micol J-B. L'hématopoïèse clonale : un concept émergent à la croisée des spécialités. Rev Médecine Interne [Internet]. 2019 May 22; Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0248866319304928

5. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med. 2012 Mar 22;366(12):1079–89.

6. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med. 2013 May 30;368(22):2059–74.

7. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Blood. 2017 Jan 26;129(4):424–47.

8. Röllig C, Ehninger G. How I treat hyperleukocytosis in acute myeloid leukemia. Blood. 2015 May 21;125(21):3246–52.

9. Lerolle N, Borgel D, Diehl J-L. Approche critique des critères diagnostiques de coagulation intravasculaire disséminée. Réanimation. 2008 Jun 1;17(4):348–54.

10. A Kabel, F Zamzami, M Al-Talhi, K Al-Dwila, R Hamza. Acute myeloid leukemia: A focus on risk factors, clinical presentation, diagnosis and possible lines of management. 2017;5(2):62–7.

11. Béné MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W, et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. Leukemia. 2011 Apr;25(4):567–74.

12. Isabelle Luquet, Audrey Bidet, Wendy Cuccuini, Marina Lafage-Pochitaloff, Marie-Joelle Mozziconacci, Christine Terré. Place de la cytogénétique dans la prise en charge des leucémies aiguës myéloïdes : actualisation par le Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH). An Biol Clin. 2016 Oct;74(5):535–46.

13. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Beau MML, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016 May 19;127(20):2391–405.

14. Creutzig U, Heuvel-Eibrink MM van den, Gibson B, Dworzak MN, Adachi S, Bont E de, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. Blood. 2012 Oct 18;120(16):3187–205.

15. Llopis L, Nibourel O, Boissel N, Huchette P, Renneville A, Abdelhamid E, et al. Implication des mutations des gènes *IDH1* et *IDH2* dans les leucémies aiguës myéloïdes. Hématologie. 2011 May 1;17(2):132–44.

16. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med. 2016 Jun 9;374(23):2209–21.

17. Rowe JM, Tallman MS. How I treat acute myeloid leukemia. Blood. 2010 Oct 28;116(17):3147–56.

18. Ossenkoppele G, Löwenberg B. How I treat the older patient with acute myeloid leukemia. Blood. 2015 Jan 29;125(5):767–74.

19. Hu J, Liu Y-F, Wu C-F, Xu F, Shen Z-X, Zhu Y-M, et al. Long-term efficacy and safety of all-trans retinoic acid/arsenic trioxide-based therapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci. 2009 Mar 3;106(9):3342–7.

20. Hills RK, Castaigne S, Appelbaum FR, Delaunay J, Petersdorf S, Othus M, et al. Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. Lancet Oncol. 2014 Aug;15(9):986–96.

21. Prada-Arismendy J, Arroyave JC, Röthlisberger S. Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. Blood Rev. 2017 Jan 1;31(1):63–76.

22. Zachari D. Smith, Alexander Meissner. DNA methylation: roles in mammalian developmen. Nat Rev Genet. 2013;(14):204–20.

23. Meldi KM, Figueroa ME. Cytosine modifications in myeloid malignancies. Pharmacol Ther. 2015 Aug 1;152:42–53.

24. Li W, Xu L. Epigenetic Function of TET Family, 5-Methylcytosine, and 5-Hydroxymethylcytosine in Hematologic Malignancies. Oncol Res Treat. 2019;42(6):309–18.

25. Kulis M, Esteller M. DNA Methylation and Cancer. In: Advances in Genetics [Internet]. Elsevier; 2010 [cited 2018 Aug 3]. p. 27–56. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123808660600022

26. Vasanthakumar A, Godley LA. 5-hydroxymethylcytosine in cancer: significance in diagnosis and therapy. Cancer Genet. 2015 May 1;208(5):167–77.

27. Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2004 Nov 15;22(22):4632–42.

28. Ecsedi S, Rodríguez-Aguilera JR, Hernandez-Vargas H. 5-Hydroxymethylcytosine (5hmC), or How to Identify Your Favorite Cell. Epigenomes. 2018 Jan 30;2(1):3.

29. Nestor CE, Ottaviano R, Reddington J, Sproul D, Reinhardt D, Dunican D, et al. Tissue type is a major modifier of the 5-hydroxymethylcytosine content of human genes. Genome Res. 2012 Mar 1;22(3):467–77.

30. Dawlaty MM, Ganz K, Powell BE, Hu Y-C, Markoulaki S, Cheng AW, et al. Tet1 is dispensable for maintaining pluripotency and its loss is compatible with embryonic and postnatal development. Cell Stem Cell. 2011 Aug 5;9(2):166–75.

31. Pronier E, Almire C, Mokrani H, Vasanthakumar A, Simon A, da Costa Reis Monte Mor B, et al. Inhibition of TET2-mediated conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine disturbs erythroid and granulomonocytic differentiation of human hematopoietic progenitors. Blood. 2011 Sep 1;118(9):2551–5.

32. Gu T-P, Guo F, Yang H, Wu H-P, Xu G-F, Liu W, et al. The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. Nature. 2011 Sep 4;477(7366):606–10.

33. Gaidzik VI, Schlenk RF, Paschka P, Stölzle A, Späth D, Kuendgen A, et al. Clinical impact of DNMT3A mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: results of the AML Study Group (AMLSG). Blood. 2013 Jun 6;121(23):4769–77.

34. Gross S, Cairns RA, Minden MD, Driggers EM, Bittinger MA, Jang HG, et al. Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. J Exp Med. 2010 Feb 15;207(2):339–44.

35. Weissmann S, Alpermann T, Grossmann V, Kowarsch A, Nadarajah N, Eder C, et al. Landscape of *TET2* mutations in acute myeloid leukemia. Leukemia. 2012 May;26(5):934–42.

36. Huang H, Jiang X, Li Z, Li Y, Song C-X, He C, et al. TET1 plays an essential oncogenic role in MLL-rearranged leukemia. Proc Natl Acad Sci. 2013 Jul 16;110(29):11994–9.

37. 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 Dec 14;18(6):553–67.

38. Rampal R, Alkalin A, Madzo J, Vasanthakumar A, Pronier E, Patel J, et al. DNA Hydroxymethylation Profiling Reveals that WT1 Mutations Result in Loss of TET2 Function in Acute Myeloid Leukemia. Cell Rep. 2014 Dec 11;9(5):1841–55.

39. Montalban-Bravo Guillermo, Garcia-Manero Guillermo. Myelodysplastic syndromes: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management. Am J Hematol. 2017 Dec 7;93(1):129–47.

40. Chowdhury B, McGovern A, Cui Y, Choudhury SR, Cho I-H, Cooper B, et al. The hypomethylating agent Decitabine causes a paradoxical increase in 5-hydroxymethylcytosine in human leukemia cells. Sci Rep. 2015 Apr 22;5:9281.

41. Vető B, Szabó P, Bacquet C, Apró A, Hathy E, Kiss J, et al. Inhibition of DNA methyltransferase leads to increased genomic 5-hydroxymethylcytosine levels in hematopoietic cells. FEBS Open Bio. 2018;8(4):584–92.

42. Itzykson R, Kosmider O, Cluzeau T, Mansat-De Mas V, Dreyfus F, Beyne-Rauzy O, et al. Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. Leukemia. 2011 Jul;25(7):1147–52.

43. Sarah BERTOLI. Vol. 8 N°4 Déc. 2018 : leucémies aiguës myéloblastiques(LAM) Inhibiteurs d'IDH1 et 2 [Internet]. Horizons Hémato. 2019 [cited 2019 Jul 12]. Available from: http://horizonshemato.com/horizons-hemato-vol-8-n4-dec-2018

44. IDHIFA 50 mg, comprimé - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cited 2019 Jul 12]. Available from: https://www.ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-temporaires-d-utilisation-ATU/Referentiel-des-ATU-nominatives/Referentiel-des-ATU-nominatives/IDHIFA-50-mg-comprime-nbsp

45. Métabolisme du fer chez l'Homme, laboratoire d'hématologie cellulaire du CHU d'Angers [Internet]. [cited 2019 Jul 18]. Available from: http://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/globules-rouges-et-leur-pathologie/43-metabolisme-du-fer-chez-lhomme

46. Singh B, Arora S, Agrawal P, Gupta SK. Hepcidin: A novel peptide hormone regulating iron metabolism. Clin Chim Acta. 2011 May 12;412(11):823–30.

47. Park S, Kosmider O, Maloisel F, Drenou B, Chapuis N, Lefebvre T, et al. Dyserythropoiesis evaluated by the RED score and hepcidin:ferritin ratio predicts response to erythropoietin in lower-risk myelodysplastic syndromes. Haematologica. 2019 Mar 1;104(3):497–504.

48. E Pourcelot. Rôle du fer et des espèces réactives de l'oxygène dans la prolifération et la différenciation des leucémies aiguës myéloblastiques. 2013 Oct;

49. Yu Y, Kovacevic Z, Richardson DR. Tuning Cell Cycle Regulation with an Iron Key. Cell Cycle. 2007 Aug 15;6(16):1982–94.

50. Scourzic L, Mouly E, Bernard OA. TET proteins and the control of cytosine demethylation in cancer. Genome Med. 2015;7(1):9.

51. Yin R, Mo J, Dai J, Wang H. Nickel(II) Inhibits Tet-Mediated 5-Methylcytosine Oxidation by High Affinity Displacement of the Cofactor Iron(II). ACS Chem Biol. 2017 Jun 16;12(6):1494–8.

52. ExPASy - Cellosaurus [Internet]. [cited 2019 Jul 12]. Available from: https://web.expasy.org/cellosaurus/

53. Didier Grunwald, Jean-François Mayol, Xavier Ronot. Cycle cellulaire et cytométrie en flux. Lavoisier.

54. Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, Hills RK, Daly S, Jovanovic JV, et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2009 Nov 1;27(31):5195–201.

55. Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers [Internet]. [cited 2019 Jul 12]. Available from: http://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/hematologie-et-pathologie-generale/28-leucemies-aigues-myeloides

56. Le N. The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells. Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer. 2002 Oct 2;1603(1):31–46.

57. Jiang Y, Falk J, Jin M, Liu D, Maciejewski JP. Global Methylome of Normal and Malignant Hematopoietic Stem Cells. Blood. 2007 Nov 16;110(11):2118–2118.

58. Foksinski M, Zarakowska E, Gackowski D, Skonieczna M, Gajda K, Hudy D, et al. Profiles of a broad spectrum of epigenetic DNA modifications in normal and malignant human cell lines: Proliferation rate is not the major factor responsible for the 5-hydroxymethyl-2′-deoxycytidine level in cultured cancerous cell lines. PLOS ONE. 2017 Nov 30;12(11):e0188856.

59. Hider RC, Hoffbrand AV. The Role of Deferiprone in Iron Chelation. N Engl J Med. 2018 Nov 29;379(22):2140–50.

60. PubChem. Ferric ammonium citrate [Internet]. [cited 2019 Jul 30]. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14457

61. Li W, Liu M. Distribution of 5-Hydroxymethylcytosine in Different Human Tissues [Internet]. Journal of Nucleic Acids. 2011 [cited 2019 Aug 28]. Available from: https://www.hindawi.com/journals/jna/2011/870726/abs/

62. Kroeze LI, Aslanyan MG, Rooij A van, Koorenhof-Scheele TN, Massop M, Carell T, et al. Characterization of acute myeloid leukemia based on levels of global hydroxymethylation. Blood. 2014 Aug 14;124(7):1110–8.

63. Ahn J-S, Kim H-J, Kim Y-K, Lee S-S, Ahn S-Y, Jung S-H, et al. 5-Hydroxymethylcytosine correlates with epigenetic regulatory mutations, but may not have prognostic value in predicting survival in normal karyotype acute myeloid leukemia. Oncotarget. 2016 Dec 26;8(5):8305–14.

64. ClinVar [Internet]. [cited 2019 Jul 24]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/

65. Xue YM, Cheng HC, Wang JH, Wang W, Miao L. Cytosine 5-hydroxymethylation regulated kit gene expression in acute myeloid leukemia. J Biol Regul Homeost Agents. 2019;33(2):345–53.

66. Russler-Germain DA, Spencer DH, Young MA, Lamprecht TL, Miller CA, Fulton R, et al. The R882H DNMT3A Mutation Associated with AML Dominantly Inhibits Wild-Type DNMT3A by Blocking Its Ability to Form Active Tetramers. Cancer Cell. 2014 Apr 14;25(4):442–54.

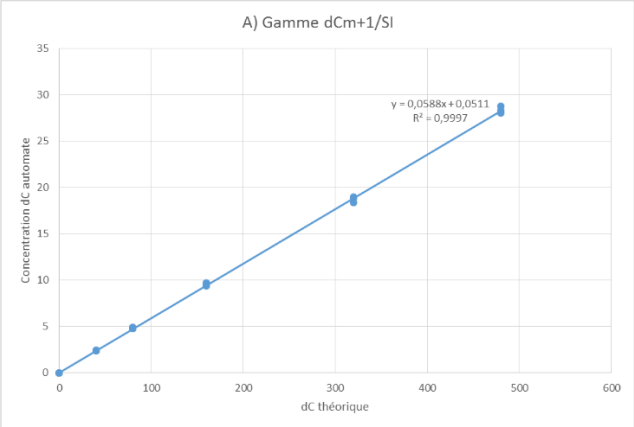
67. Figueroa ME, Lugthart S, Li Y, Erpelinck-Verschueren C, Deng X, Christos PJ, et al. DNA Methylation Signatures Identify Biologically Distinct Subtypes in Acute Myeloid Leukemia. Cancer Cell. 2010 Jan 19;17(1):13–27.

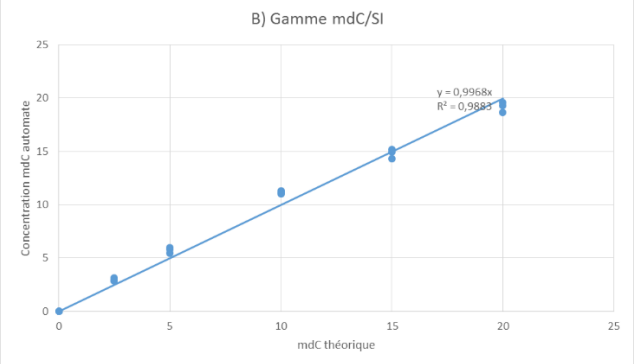
Annexes

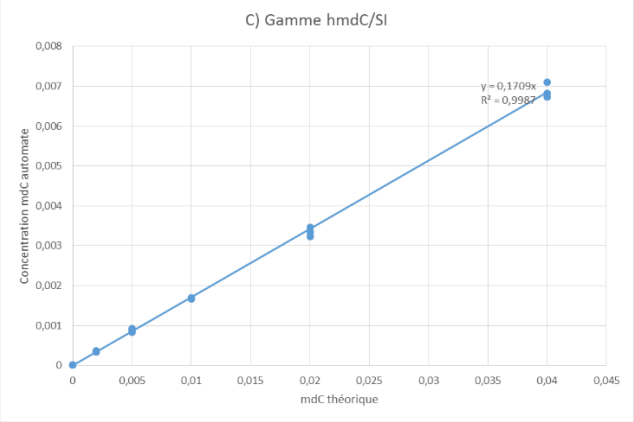
Annexe 2 : Liste des mutations recherchées par NGS myéloïde au CHU de Lille

Gène	Exons séquencés
ASXL1 (NM_015338)	Exons 11 et 12
BCOR (NM_001123385)	Exons 2 à 15
BCORL1 (NM_021946)	Exons 1 à 12
CALR (NM_004343)	Exon 9
CBL (NM_005188)	Exons 8 et 9
CSF3R (NM_156039)	Exons 14 à 17
DNMT3A (NM_022552)	Exons 2 à 23
ETV6 (NM_001987)	Exons 1 à 8
EZH2 (NM_004456)	Exons 2 à 20
GATA2 (NM_032638)	Exons 2 à 6
JAK2 (NM_004972)	Exons 12 et 14
IDH1 (NM_005896)	Exon 4
IDH2 (NM_002168)	Exon 4
KIT (NM_000222)	Exons 8 à 11 et 17
KRAS (NM_033360)	Exons 2 et 3
MPL (NM_005373)	Exon 10
NIPBL (NM_133433)	Exons 2 à 47
NPM1 (NM_002520)	Exon 11
NRAS (NM_002524)	Exons 2 et 3
PHF6 (NM_001015877)	Exons 2 à 10
PTPN11 (NM_002834)	Exon 3 et 13
RAD21 (NM_006265)	Exons 2 à 14
RIT1 (NM_006912)	Exon 5
RUNX1 (NM_001001890)	Exons 1 à 6
SETBP1 (NM_015559)	Exon 4
SF3B1 (NM_012433)	Exon 13 à 16
SMC1A (NM_006306)	Exons 1 à 25
SMC3 (NM_005445)	Exons 1 à 29
SRSF2 (NM_003016)	Exon 1
STAG2 (NM_001042749)	Exons 3 à 35
TET2 (NM_001127208)	Exons 3 à 11
TP53 (NM_001126112)	Exons 3 à 11
U2AF1 (NM_006758)	Exons 2 et 6
WT1 (NM_024426)	Exons 7 et 9
ZRSR2 (NM_005089)	Exons 1 à 11

Annexe 1 : Courbes de calibration de la dCyd, la 5mdCyd et la 5hmdCyd







Faculté de Pharmacie,
Université Grenoble Alpes

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 ».

Simon Chevalier

LA METHYLATION DE L'ADN DANS LES LEUCEMIES AIGUES MYELOBLASTIQUES : IMPACT DE LA CHELATION DU FER ET VALEURS CLINIQUES

RÉSUMÉ :

L'identification des anomalies génétiques dans les leucémies aigües myéloblastiques (LAM) est aujourd'hui indispensable pour caractériser la pathologie. Ces mutations apparaissent souvent dans les gènes impliqués dans la régulation de la méthylation de l'ADN notamment *DNMT3A, TET2* et *IDH*. Les objectifs de ces travaux ont été d'une part, d'étudier les taux de 5-méthylcytosine (5mC) et de 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC) dans les LAM, d'autre part d'évaluer les liens entre la méthylation de l'ADN et le fer.

Nous avons mesuré les taux de 5mC et 5hmC, dans un premier temps dans des échantillons médullaires de 25 patients atteints de LAM et, dans un second temps dans les lignées leucémiques KG1, HL60, K562, OCI-AML3 et HEL privées en fer par chélation avec la déféroxamine, puis re-supplémentées par la transferrine. Les mesures de 5mC et 5hmC ont été réalisées par spectrométrie de masse en tandem avec utilisation d'un standard interne isotopique.

Nous montrons que les taux de 5hmC sont différents selon le type de LAM sans variation apparente des taux de 5mC. Les taux de 5hmC sont plus faible lors de mutation *DNMT3A, IDH1/2* ou lors de l'absence d'anomalie cytogénétique et semble plus faibles lors de mutation de *TET2*. Lorsque le pronostic des patients est défavorable, les taux de 5hmC semblent augmentés. Quant aux lignées, les taux de 5mC et 5hmC à l'état basal sont différents selon la lignée étudiée et lors d'une privation en fer, les taux de 5mC augmentent sans variation des taux de 5hmC.

L'étude et la caractérisation des signatures épigénétiques des LAM pourraient, à terme permettre l'utilisation de ces biomarqueurs en pratique clinique pour la prise en charge personnalisée des LAM.

MOTS CLÉS : LAM, épigénétique, méthylation, fer, 5-méthylcytosine, 5-hydroxyméthylcytosine

Adresse : [Données à caractère personnel]