



**HAL**  
open science

# Caractérisation de profils chemogénomiques et épigénétiques de leucémies aigües lymphoblastiques : une étude translationnelle sur échantillons de patients

Astrid Gabarre

► **To cite this version:**

Astrid Gabarre. Caractérisation de profils chemogénomiques et épigénétiques de leucémies aigües lymphoblastiques : une étude translationnelle sur échantillons de patients. Sciences pharmaceutiques. 2021. dumas-03173499

**HAL Id: dumas-03173499**

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03173499v1>

Submitted on 18 Mar 2021

**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.

MÉMOIRE  
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES  
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le

10 Mars 2021

Par Mme Astrid GABARRE  
Née le 19/08/1991

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76  
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

**TITRE :**

**Caractérisation de profils chemogénomiques et épigénétiques  
de leucémies aigües lymphoblastiques :  
une étude translationnelle sur échantillons de patients**

----oOo----

**JURY :**

Président : Mr le Professeur Romaric LACROIX

Membres : Mr le Professeur Regis COSTELLO  
Mr le Docteur Eddy PASQUIER (Co-Directeur)  
Mr le Docteur Yves COLLETTE (Co-Directeur)

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05  
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

**ADMINISTRATION :**

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI, M. Guillaume HACHE
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Patrice VANELLE, M. Pierre TIMON-DAVID,
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Henri PORTUGAL, M. Philippe CHARPIOT
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Aurélie BELENGUER
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

**DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE**

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

**PROFESSEURS**

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Philippe PICCERELLE

**MAITRES DE CONFERENCES**

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI  
Mme Odile RIMET-GASPARINI  
Mme Pascale BARBIER  
M. François DEVRED  
Mme Manon CARRE  
M. Gilles BREUZARD  
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA  
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,  
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE  
M. Emmanuel CAUTURE  
Mme Véronique ANDRIEU  
Mme Marie-Pierre SAVELLI

BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE ET BIOTHERAPIES  
PHARMACO ECONOMIE, E-SANTE

M. Jérémy MAGALON  
Mme Carole SIANI

**ENSEIGNANTS CONTRACTUELS**

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

**DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE**

Responsable : Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE

**PROFESSEURS**

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE  
Mme Laurence CAMOIN-JAU  
Mme Florence SABATIER-MALATERRE  
Mme Nathalie BARDIN

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN  
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET  
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

**MAITRES DE CONFERENCES**

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

**ATER**

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Anne-Claire DUCHEZ
BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE	Mme Alexandra WALTON

**A.H.U.**

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Mélanie VELIER
----------------------------	--------------------

**DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE**

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

**PROFESSEURS**

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOGNOSIE	Mme Evelyne OLLIVIER

**MAITRES DE CONFERENCES**

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE, BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne FAVEL  
Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Catherine DEFOORT  
M. Alain NICOLAY  
Mme Estelle WOLFF  
Mme Elise LOMBARD  
Mme Camille DESGROUAS  
M. Charles DESMARCHELIERCHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET  
NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Pierre REBOUILLON

CHIMIE THERAPEUTIQUE

Mme Sandrine ALIBERT  
Mme Caroline DUCROS  
M. Marc MONTANA  
Mme Manon ROCHE  
Mme Fanny MATHIASCHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE  
HYDROLOGIEM. Armand GELLIS  
M. Christophe CURTI  
Mme Julie BROGGI  
M. Nicolas PRIMAS  
M. Cédric SPITZ  
M. Sébastien REDON

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE

M. Riad ELIAS  
Mme Valérie MAHIOU-LEDDER  
Mme Sok Siya BUN  
Mme Béatrice BAGHDIKIAN**MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)**

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Anne-Marie PENET-LOREC

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET  
NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Cyril PUJOL

DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE

M. Marc LAMBERT

GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE  
ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET  
COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET  
GESTION DE LA PHARMAFAC

Mme Félicia FERRERA

**A.H.U.**

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

M. Mathieu CERINO

**ATER**CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET  
NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Dujé BURIC

**DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE**

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

**PROFESSEURS**

PHARMACIE CLINIQUE	M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Bruno LACARELLE Mme Frédérique GRIMALDI M. Joseph CICCOLINI

**MAITRES DE CONFERENCES**

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

**A.H.U.**

PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE PHARMACIE CLINIQUE	Mme Anaïs MOYON M. Florian CORREARD
---	--

**ATER.**

TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Anne RODALLEC
----------------------------------	-------------------

## **CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE**

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier  
M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier  
Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier  
Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier  
M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier  
Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier  
M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire  
Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint  
M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire  
M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie  
Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché  
Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint  
M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier  
M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 23 janvier 2020

## REMERCIEMENTS

Je remercie le Docteur Yves Collette pour avoir rendu cette année de recherche possible et pour son suivi tout au long de ce travail. Je remercie le Docteur Eddy Pasquier pour m'avoir consacré tout ce temps, merci pour toutes ces manip, accompagnées de ces précieuses explications et conseils. Les techniques de biologie moléculaire sont enfin devenues concrètes à mes yeux.

Je remercie bien sur toute l'équipe TrGET avec sa bonne humeur et les gouters gourmands. Merci à Rémy Castellano pour m'avoir aiguillé régulièrement sur les axes de mon travail, à Camille pour la précision de ces explications, à Audrey pour les coups de main en cellulaire, Manon, Emma et Armelle pour m'avoir accueillie dans leur bureau.

Je remercie également le Professeur Romaric Lacroix de m'avoir encadré pendant mon internat et pour avoir accepté de présider ma soutenance de thèse.

Je remercie le Professeur Regis Costello d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Merci à ma famille et à mes amis pour leur soutien tout au long de ces années.

## RESUME

La leucémie aigüe lymphoblastique (LAL) représente environ 800 cas/an en France, c'est le cancer le plus fréquent chez l'enfant. Les protocoles actuels permettent d'obtenir un taux de survie moyen chez l'enfant de 90%. Cependant, le pronostic de certaines LAL reste très péjoratif, notamment chez l'adulte et dans des LAL associées à certaines anomalies génétiques. La LAL-B t(1 ;9)(q24 ;q34) caractérisée par la transcrite de fusion RCSD1-Abl1 est une LAL-B Philadelphie-like de mauvais pronostic, résistantes au traitement standard à base de chimiothérapies intensives. La rareté de la LAL-B t(1 ;9)(q24 ;q34) explique la méconnaissance du pouvoir oncogénique du produit de fusion RCSD1-Abl1 et la difficulté de réaliser des essais cliniques pour ces patients.

Nos travaux ont consisté d'abord en l'établissement d'un profil *ex vivo* de sensibilité/résistance à 79 agents anticancéreux d'un panel de 10 LAL-B établis en PDX (Patient-Derived Xenograft), comprenant les échantillons issus de 3 patients porteurs de t(1 ;9)(q24 ;q34), puis en l'étude ciblée des bases moléculaires des réponses différenciées de ces LAL-B.

Nos travaux ont mis en évidence une sensibilité exacerbée des 3 patients LAL-B t(1 ;9)(q24 ;q34) aux inhibiteurs de bromodomains (drogues modulant certains mécanismes de régulation épigénétique). Nous avons complété ce résultat d'une analyse par séquençage CUT & RUN visant à identifier les gènes cibles associés à cette réponse différentielle. Notre approche ouvre de nouvelles pistes pour une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques associés à l'agressivité de ces leucémies rares et pouvant constituer de nouvelles approches à visée thérapeutique.

## ABREVIATIONS

BET : protéines à bromodomains

BRDi : inhibiteurs des protéines à bromodomains

CUT and RUN : cleavage under targets and release using nuclease

CRCM : centre de recherche en cancérologie de Marseille

DNMTi : inhibiteurs de DNA-méthyltransférases

EC50 : concentration efficace à 50%

FLT3 : FMS like tyrosine kinase 3

HAT : histone acétyltransférase

HMT : histone méthyltransférase

HDAC : histone déacétylase

HDACi : inhibiteurs d'histone déacétylases

ITK : inhibiteurs de tyrosines kinases

JNJD6 : Jumonji C-domain-containing protein 6

LAL-B : leucémie aigüe lymphoblastique de lignée B

LAL-B Ph<sup>+</sup> : leucémie aigüe lymphoblastique de lignée B à chromosome de Philadelphie

LAL-T : leucémie aigüe lymphoblastique de lignée T

LAM : leucémie aigüe myéloïde

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases

PDX : xénogreffes dérivées de patients

qRT-PCR : reverse transcription PCR quantitative

## **TABLE DES MATIERES**

### **1) INTRODUCTION**

#### **A) LAL**

- a) Leucémie aigüe lymphoblastique de la lignée B
- b) LAL-B Ph+ et Ph-like
- c) LAL-B RCSD1-Ab11

#### **B) L'étude de l'épigénétique et épithérapies**

##### **a) La régulation des cellules par l'épigénétique**

- 1. Organisation de la chromatine
- 2. Mécanismes de la régulation épigénétique

##### **b) Les épidrogues**

- 1. Les protéines à bromodomains, cibles des BRDi
- 2. Les inhibiteurs de bromodomains (BRDi)

#### **C) Problématique et objectifs**

### **2) MATERIELS ET METHODES**

- a) sélection des patients et matériel biologique
- b) Utilisation du modèle murin
- c) profils de sensibilité/résistance aux drogues
- d) étude épigénétique : CUT and RUN
- e) étude de l'expression des gènes : RT-PCR

### **3) RESULTATS**

- a) Etude des profils de sensibilité/résistance aux drogues
- b) Résultats de l'étude de l'expression des gènes par qRT-PCR
- c) Résultats préliminaires du CUT and RUN

#### **4) DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

- a) Interprétation et perspectives de l'analyse épigénétique
- b) Perspectives au niveau post traductionnel : Analyses phosphoprotéomiques
- c) Perspectives au niveau protéomique et transcriptomique
- d) Perspectives sur les PDX
- e) Profils de sensibilité/résistance au birinapant et au gilteritinib et perspectives

#### **5) CONCLUSION**

## 1) INTRODUCTION

### A) La leucémie aigüe lymphoblastique

#### a) Généralités sur la LAL

La leucémie aigüe lymphoblastique (LAL) est le cancer le plus fréquent chez l'enfant et représente en France environ 400 cas/an (<15ans). C'est une hémopathie maligne caractérisée par une prolifération clonale intra-médullaire de précurseurs hématopoïétiques immatures (appelés blastes) et d'origine lymphoïde. La présentation clinique de la maladie est une altération souvent rapide de l'état général. L'envahissement des cellules cancéreuses dans les organes est responsable d'un syndrome tumoral, pouvant comprendre des adénopathies, splénomégalie, hépatomégalie, douleurs osseuses... Par ailleurs, certains signes cliniques sont associés aux stigmates des cytopénies que cause l'envahissement médullaire. L'anémie est responsable d'une pâleur, asthénie, vertiges, acouphènes, dyspnée, tachycardie... La thrombopénie du syndrome hémorragique (hémorragies cutanéomuqueuses et hématomes spontanés) et la neutropénie de syndromes infectieux (sepsis, pneumopathie...). Le tableau biologique classique est une pancytopenie associée à une blastose sanguine. Le diagnostic est à confirmer par un myélogramme, avec un envahissement médullaire de blastes > 20%. La classification des LAL est réalisée par cytométrie de flux et cytogénétique.

La leucémie aigüe lymphoblastique de la lignée B (LAL-B) représente 85% LAL chez l'enfant et 75% des LAL de l'adulte. Les anomalies cytogénétiques les plus fréquentes sont les LAL-B hyperploïdes (30% des LAL-B de l'enfant), la LAL-B avec gène de fusion TEL-AML1 (25% des LAL-B de l'enfant), la LAL-B avec réarrangement MLL (80% des LAL-B chez le nourrisson <1 an), la LAL-B Ph+, avec gène de fusion BCR-Abl1 (30% des LAL de l'adulte, 3% des LAL de l'enfant), et enfin la LAL-B Ph-like (15 à 30% des LAL-B), qui a de nombreuses caractéristiques géniques avec la LAL-B Ph+, mais renferme plus de 50 anomalies cytogénétiques différentes (protéines de fusions à activité tyrosines kinases autres que BCR-Abl1, dérégulation des voies des récepteurs des cytokines...).

La prise en charge est une urgence thérapeutique et repose sur des protocoles de traitement complexes et préétablis. Les plus fréquents associent des corticoïdes, de la vincristine associée à une anthracycline ou de l'asparaginase. D'autres médicaments peuvent être associés, tels que la cytarabine, l'étoposide, le cyclophosphamide, le méthotrexate. Grâce aux protocoles actuels, le taux de survie moyen des LAL chez l'enfant est de 90%. Le pronostic des LAL reste toutefois très péjoratif chez l'adulte et dans certains cas de LAL-B avec des mutations particulières.

## b) Leucémies aiguës lymphoblastiques Ph+ et Ph-like

Les LAL-B Ph+ sont caractérisées par une anomalie cytogénétique récurrente : la t(9 ;22)(q34 ;q11) caractérisée par le transcrite de fusion BCR-Abl1. Les LAL-B Ph-like sont, à l'inverse, une classe de LAL constituées d'une multitude d'anomalies cytogénétiques différentes. Cette classe de leucémie est effective dans la mise à jour de la classification depuis 2016. La classification de l'OMS de 2008 classait ce groupe hétérogène de leucémie dans le groupe « LAL non classées ». Les LAL-B Ph-like présentent un même profil transcriptomique que les LAL Ph+. On retrouve principalement 4 types d'altérations :

- Dérégulation des voies des récepteurs des cytokines (CRLF2) qui sont les plus fréquentes (47% des LAL Ph-like) <sup>1</sup>
- Dérégulation des tyrosines kinases (ABL1, PDGFRA/B, JAK2). Les LAL-B avec réarrangements de gènes impliquant ABL1 sont ainsi une petite proportion des LAL Ph-like. C'est au sein de cette entité que figure la LAL-B avec transcrite de fusion RCSD1-Abl1.
- Les réarrangements de JAK2 ou EPOR
- Les mutations ou délétions activatrices des voies JAK-STAT ou MAPK

Fait intéressant, la délétion du gène IKZF1 qui code pour le facteur de transcription IKAROS (impliqué dans le développement des lignées hématopoïétiques), est retrouvée dans 70% des patients atteints de LAL-B Ph-like, de manière indépendante du transcrite de fusion. La délétion de IKZF1 est responsable de la dérégulation de la voie JAK/STAT

Les altérations génétiques des LAL-B Ph-like avec réarrangements de gènes impliquant ABL1 conduisent à une expression génique souvent similaire à la LAL Ph+ avec dérégulation de l'activité tyrosine kinase de Abl1. Des différences de structure du site actif de la kinase Abl1 et des réponses modifiées pour les ITK (ciblant Abl1) sont cependant observées dans ces réarrangements. En effet, l'autre protéine n'a pas la même fonction ni la même structure que BCR, et que le clivage d'Abl1 se fait à différents endroits.

### La protéine Abelson, protéine Abl1

La famille des protéines Abl comprend 2 membres : Abl et Arg (Abl-related gene). La protéine Abl est une tyrosine kinase non-récepteur, codée par le gène ABL1 sur le chromosome 9. ABL1 est un

proto-oncogène. Il code pour Abl, qui est une protéine cytoplasmique et nucléaire impliquée dans de multiples voies : différenciation cellulaire, division cellulaire, adhésion cellulaire, réponse au stress via des signaux apoptotiques... La protéine Abl est présente à faible taux dans de nombreux tissus et types cellulaires, on la retrouve dans le noyau, le cytoplasme, les membranes... Il existe 2 isoformes de Abl : Abl1a et Abl1b, codées par la même gène ABL1, qui diffèrent principalement au niveau de la queue N-terminale.

Structure :

La protéine Abl se compose de différents domaines :

- Un domaine kinase SH1 qui est le domaine crucial de la transformation en oncogène de la protéine Abl1. Ce domaine est constitué de deux lobes N (N-terminal) et C (C-terminal). Trois boucles sont responsables de l'activité kinase : la boucle P (phosphate binding loop), la boucle d'activation et la boucle C (activité catalytique).
- Deux domaines d'interaction protéine-protéines SH3 et SH2. SH2 permet d'auto-inhiber la fonction kinase par interaction avec le domaine catalytique de SH1 (elle cache la tyrosine 412 de SH1 par une interaction hydrophobe et bloque ainsi sa phosphorylation)
- un long domaine N-terminal appelé N-Cap avec le groupe myristoyl qui permet l'autoinhibition de l'activité kinase (SH1) et stabilise la protéine en formant un verrou qui participe à la conformation fermée de la protéine.<sup>2</sup> Seul l'isoforme Abl1b possède le groupement myristoyl. Le mécanisme de régulation de l'isoforme Abl1a dénué du groupement myristoyl n'est pas entièrement elucidé<sup>3</sup>.
- Elle possède également 3 signaux de localisation nucléaires, 3 régions de liaison à l'ADN et un domaine de liaison à l'actine en C-terminal

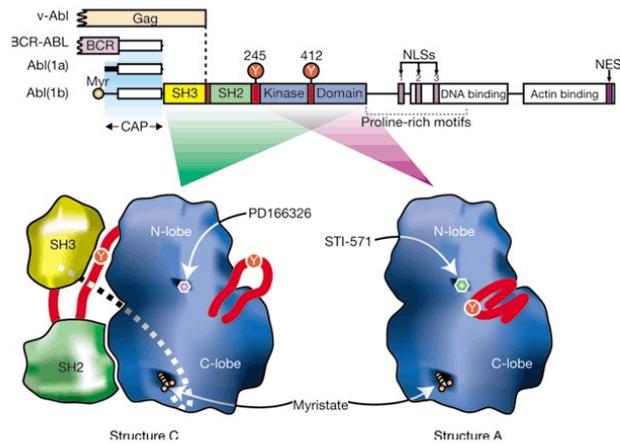


Figure 1 : schéma illustrant l'auto-inhibition contrôlée par Abl <sup>4</sup>

La protéine Abl est le plus souvent sous forme inactive (conformation fermée). Elle peut changer de conformation, s'ouvrir et devenir active. Il existe des stades intermédiaires à ces deux conformations. La protéine Abl est capable de s'auto-inhiber et de s'activer rapidement et de façon précise en fonction des signaux provenant de la protéine elle-même et autres molécules dans la cellule (c-Jun, p73...)<sup>5</sup>. La protéine Abl peut être activée par des stress cellulaires lors d'accumulation de ROS (espèces réactives de l'oxygène) et déclenche des signaux d'apoptose. Ce phénomène est amplifié en contexte tumoral, le proto-oncogène ABL1 est dérégulé.

### Transcrit de fusion BCR-Abl1 et pouvoir oncogénique

La protéine de fusion impliquant Abl1 et que l'on retrouve le plus fréquemment en pathologie humaine est le transcrit de fusion BCR-Abl1. Cette protéine de fusion est la conséquence de la translocation t(9;22)(q34;q11) dans 95% des cas, dans les 5% restant, il s'agit de translocations variantes intéressant le chromosome 22.

Cette protéine chimérique a été découverte comme responsable de la leucémogénèse dans la leucémie myéloïde chronique (LMC) mais est aussi présent dans 30% des LAL de l'adulte et 3% des LAL de l'enfant.

Il existe trois points de cassure du gène BCR : m-BCR, M-BCR,  $\mu$ -BCR faisant respectivement 190, 210 et 230 kDa. Plus le fragment BCR est court plus le phénotype semble agressif. La protéine chimérique la plus souvent retrouvée dans la LMC est M-BCR dans 95% des LMC, alors que c'est m-BCR dans la LAL (70% des cas de l'adulte et 90% des cas de l'enfant).

Abl est coupé au niveau du 46eme AA à partir de la région N-terminale, cette région régulatrice majeure de l'activité kinase est remplacée par la protéine BCR. Par ailleurs, une région de BCR (197-385 AA) interagit avec SH2 et empêche sa position en conformation fermée. Ainsi la protéine kinase BCR-Abl1 est anormale et la structure tridimensionnelle du domaine kinase de Abl1 est différente de la protéine originelle. L'activité kinase est très augmentée car elle n'a plus ses caractéristiques d'auto-inhibition, elle est constamment active, contrairement à Abl qui se trouve à l'état « normal » sous forme fermée (inactive).

Le pouvoir oncogénique de BCR-Abl1 s'explique par l'activation de nombreuses voies de signalisations :

- La voie des MAP Kinases est activée, favorisant prolifération cellulaire
- La voie PI3K, Akt est également stimulée, elle inhibe p27 et stimule mTOR. Cette activation augmente la prolifération et la survie cellulaire.
- La voie des STATs est également activée par différentes voies. STAT5 peut être activée via JAK2, via des kinases de la famille des Src<sup>6</sup>, ou encore de manière directe par liaison de STAT5 au domaine SH2 de BCR-Abl1<sup>7</sup>. L'hyperactivation de STAT5 est aussi responsable d'une prolifération et survie cellulaire.

La médecine personnalisée a permis d'améliorer la survie des patients LAL-B Ph+, autrefois de sombre pronostic. L'apport de l'imatinib au protocole standard a permis d'obtenir des taux de rémission complète de 90 à 100% avec une amélioration spectaculaire de la médiane de survie<sup>8</sup>. Cependant certains types de LAL sont encore de très mauvais pronostic comme la LAL-B Ph-like.

Autres LAL impliquant la protéine Abl1 : les principales LAL-B Ph-like avec transcrit de fusion impliquant Abl1

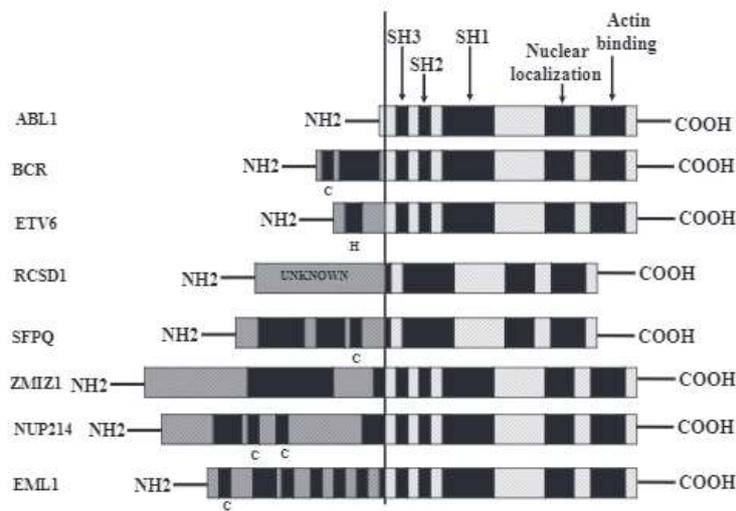


Figure 2 : Divers point de cassures de la protéine Abl dans les LAL-B Ph<sup>+</sup> et Ph-like avec réarrangements impliquant ABL1<sup>9</sup>

Les transcrits de fusion impliquant l'oncogène ABL1 les plus souvent retrouvés dans la littérature sont NUP214-Abl1 et ETV6-Abl1 puis RCSD1-Abl1.

- NUP214-ABL1 est la deuxième chimère impliquant Abl1 après BCR-Abl1. La Nucleoporine 214 (NUP214), est la protéine codée par le gène NUP214 sur le chromosome 9. Les nucléoporines sont un des constituants principaux des pores nucléaires, et sont indispensables à la progression du cycle cellulaire et du transport nucléocytoplasmique des éléments au sein de la cellule. Cette protéine de fusion est retrouvée dans environ 6% des LAL-T.<sup>10</sup> De Keersmaecker et al ont montré in vitro que cette protéine chimérique NUP214-Abl1 est une tyrosine kinase moins active que BCR-Abl1 et elle phosphoryle des voies différentes que BCR-Abl1<sup>11</sup>
- ETV6-Abl1 est la 3<sup>ème</sup> protéine de fusion impliquant Abl1. ETV6 (TEL variant 6) est un facteur de transcription impliqué dans de nombreuses fonctions telle que la croissance des cellules (notamment cellules hématopoïétiques). Cette protéine est codée par le gène ETV6 sur le chromosome 12. On la retrouve impliquée dans plusieurs cancers du sang : la LMC, la LAL-B, la LAL-T et la LAM. Un dépistage systématique réalisé en Italie et en République tchèque de 2003 à 2014 a permis d'estimer la fréquence de ETV6-Abl1 à 0,17% chez l'enfant (6 cas sur 3610) et 0,38% chez l'adulte (4/1060), soit environ 100 fois moins fréquent de BCR-Abl1<sup>12</sup>. La fusion de ETV6-Abl1 est responsable d'une protéine de fusion ayant un profil génomique

et une évolution clinique proche des pathologies impliquant BCR-Abl1. Les activités kinase de ces 2 protéines de fusion semblent comparables et ont en commun de nombreuses cibles (MAPK/Erk, AKT/PKB...) <sup>13</sup>

- La protéine de fusion RCSD1-Abl1 est la 4<sup>ème</sup> protéine de fusion retrouvée impliquant Abl1. Ce réarrangement fait l'objet de mon sujet d'étude et est développé ci-dessous.

### **c) La LAL-B avec réarrangement RCSD1-Abl1 :**

#### **Fréquence et historique :**

Ce réarrangement particulier fait l'objet de mon sujet d'étude. A ce jour, moins d'une vingtaine de ce type de LAL-Ph-like a été rapporté. RCSD1-Abl1 bien que très rarement impliqué en pathologie est le 4<sup>ème</sup> réarrangement impliquant ABL1. Le premier case report a été décrit en 2007 dans Leukemia par De Braekeleer et al. en Bretagne <sup>14</sup> mais le patient ayant eu la première LAL-B RCSD1-Abl1 de l'histoire a été diagnostiqué en 2001 en Autriche et fut publié en 2016 <sup>15</sup>. Ce patient fait notamment partie de notre cohorte de patient sur laquelle porte ces travaux. La présence du transcrit RCSD1-Abl1 implique un très mauvais pronostic.

#### **Caractéristiques cytogénétiques et moléculaires :**

Cette LAL-Ph-like est caractérisée par la translocation t(1;9)(q24 ;q34) à la cytogénétique, et le transcrit de fusion RCSD1-Abl1 à la PCR (fusion de l'exon 3 de RCSD1 sur le chromosome 1 avec l'exon 4 de ABL1 sur le chromosome 9). Le gène RCSD1 code pour la protéine CapZIP (CapZ Interacting Protein) ou RCSD1 (domain-containing protein 1). On retrouve majoritairement RCSD1 dans les muscles squelettiques et dans les cellules immunitaires. RCSD1 interagit avec la protéine CapZ, qui est responsable de la stabilisation des filaments d'actine pour maintenir la coiffe de l'actine. Elle est donc impliquée dans le remodelage du cytosquelette d'actine et sur la migration des cellules. RCSD1 est phosphorylée à la suite de situations de stress, par les Stress-activated protein kinases (SAPKs) et les MAP Kinases, puis entraîne l'activation de cascades de kinases conduisant à l'apoptose (Jnk, p38...) et à la différenciation cellulaire (Erk) ...

#### **Transcrit de fusion RCSD1-Abl1 et pouvoir oncogénique**

Alors que le transcrit de fusion BCR-Ab11 possède les trois domaines SH1, SH2 et SH3 de Ab11, la coupure de la protéine Ab11 par RCSD1 à l'exon 4 forme un transcrit dépourvu du pouvoir régulateur de SH3 et possède un domaine SH2 atténué, mais conserve le domaine SH1 (figure 2).<sup>16</sup>

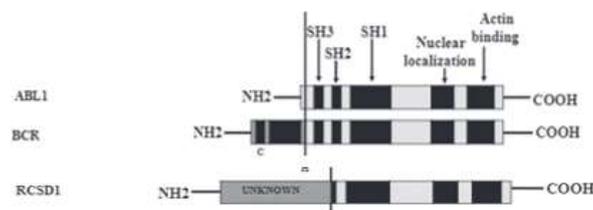


Figure 2 : points de cassures différents de la protéine Abl dans les LAL-B Ph+ et Ph-like RCSD1-Abl1 (De Braekeleer et al, 2011)

Les voies de signalisations dérégulées par RCSD1-Abl1 et les mécanismes impliqués dans le pouvoir oncogènes de ce transcrit sont très peu élucidées.

Elsa Drivet a étudié en 2017 au CRCM les voies de signalisation impactées par RCSD1-Abl1, en les comparant à des cellules BCR-Ab11. Les expériences ont mis en évidence une activation des voies PI3K/Akt, des MAP Kinases (Erk) et des STATs. Fait intéressant, l'activation de STAT5 est plus importante avec le transcrit RCSD1-Abl1 que BCR-Ab11. Le mécanisme d'action de cette stimulation n'est pas connu.

### **Intégration de patients LAL-B avec réarrangement RCSD1-Abl1 dans ma cohorte d'étude :**

Le CRCM a mis à ma disposition 3 échantillons de cette rare LAL-B :

- LALB-1 est une patiente de 26 ans, diagnostiquée en Septembre 2012<sup>17</sup>. Ce cas a été décrit en 2015 par Y. Collette et al. Il a été réalisé une étude de sensibilité d'un panel d'une vingtaine de drogues avec une attention particulière sur les ITK, ex vivo et in vivo. Ex vivo, a été réalisé un profil de sensibilité aux anticancéreux avec détermination de concentrations efficaces 50 (CE50) et in vivo par comparaison de sensibilité aux drogues sur souris NGS xénogreffées par les cellules de la patiente. L'objet de la publication était que les cellules de la patiente étaient plus sensibles au ponatinib qu'au dasatinib alors que c'est la dasatinib qui est utilisée en 1<sup>ère</sup> intention. Cette activité pour le ponatinib a également été confirmée sur le modèle PDX in vivo. L'efficacité supérieure du ponatinib par rapport au dasatinib était inattendue. La patiente a donc été traitée par ponatinib. L'attitude thérapeutique a dans ce cas été rapidement ajustée aux résultats de cette étude translationnelle.

Cette même étude a également révélé des résultats préliminaires : les cellules de cette patiente présentent une sensibilité accrue à 2 molécules testées, JQ1 et OTX015, qui sont deux inhibiteurs de bromodomaines (BDRi) et appartiennent à la classe thérapeutique des épiprodrogues. Cette nouvelle stratégie thérapeutique anti tumorale a pour but de restaurer certaines marques épigénétiques dérégulées dans le cancer. L'activité antiproliférative des BRDi pour les cellules tumorales a été démontrée dans de nombreux cancer mais les mécanismes conduisant à une sensibilité ou une résistance aux BRDi ne sont pas encore connus et il n'existe pas de biomarqueurs prédictifs de la réponse à ces drogues<sup>18</sup>. Nous avons pu étendre l'analyse à 2 autres patients atteints de LAL-B avec ce rare réarrangement génique.

- LALB-2 est une patiente de 61 ans. Le diagnostic de LAL-B RCSD1-Abl1 fu posé en Aout 2012. Elle a été traitée par le protocole GMALL, associant de la cytarabine, du methotrexate et de l'asparaginase. Elle a rechuté en Avril 2013, et fu traitée par un nouveau protocole, FLAG-Ida, associant fludarabine, cytarabine, G-CSF et idarubicine, sans succès. Elle fu ensuite incluse dans l'essai BEZ235, traitée par un PI3K/mTOR inhibiteur, sans rémission non plus. Une chimiothérapie incluant le dasatinib en Juillet 2013 permis d'obtenir une rémission partielle, mais la MRD (Measurable Residual Disease) restant positive, elle fu traitée par blinatumomab (anticorps anti CD19) en janvier 2014, et devint MDR négative. Elle fu ensuite allogreffée, avec succès (rémission de 30 mois au moment de la parution du case report)<sup>19</sup>

- LALB-3 est un patient de 15 ans diagnostiqué en Avril 2001. Il a été traité par le protocole AIEOP-BFM ALL 2000 (prednisone, daunorubicine, methotrexate, vincristne...), puis a rechuté en Juillet 2004. Il fu par la suite traité par le protocole ALL-REZ BFM 2002 (prednisolone, dexamethasone, vincristine, idarubicine, cytarabine...) associée à imatinib, qui a permis d'obtenir une MRD négative. Une monothérapie d'imatinib fu continuée pendant 69 mois et permis une rémission pendant 12 ans.<sup>20</sup>

#### Traitement :

Comme évoqué ci-dessus, ces LAL-B Ph-like sont généralement traités par des protocoles de chimiothérapies standards, et plusieurs lignes de traitement se succèdent du fait des résistances accrues aux traitements. La protéine de fusion RCSD1-Abl1, avec maintien du domaine kinase sur Abl1, incite à traiter ces patients avec les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) comme dans la LAL-B Ph+. Les premières observations qui confirment la sensibilité des patients atteints de LAL-B Ph-like aux inhibiteurs tyrosine kinase de ont été publié en 2013<sup>21</sup>. Cependant, des profils de réponses atypiques aux ITK sont décrit sur des patients porteurs de translocations impliquant le gène ABL1<sup>17</sup>, chaque protéine de fusion possède des caractéristiques qui lui sont propres.

En résumé, le pronostic des patients atteint de LAL-B avec le transcrit de fusion RCSD1-Abl1 est sombre et il n'existe pas de protocole de traitements adaptés à ces patients. Il n'est pas possible de réaliser des essais cliniques pour mettre au point des protocoles du fait de la rareté de ces leucémies. Parmi les différentes options thérapeutiques, les épithérapies sont une stratégie innovante et prometteuse, agissant sur les voies de signalisation en aval de ces protéines kinases et non directement sur l'activité kinase de la protéine.

## **B) L'étude de l'épigénétique et épithérapies**

### **a) La régulation des cellules par l'épigénétique**

L'épigénétique est définie par les mécanismes modifiant l'expression des gènes sans modifier la séquence nucléotidique. Les modifications épigénétiques sont réversibles, adaptatives, et peuvent être transmises lors des divisions cellulaires.

C'est l'épigénétique qui permet par exemple d'expliquer pourquoi, alors que nos cellules contiennent toute la même information génétique, une cellule hépatique s'exprime différemment qu'une cellule cardiaque... Le rôle de l'épigénétique est impliqué et très étudié dans de nombreuses pathologies telles que les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson...), métaboliques (obésité, diabète de type 2...) et cancers. En effet, une dérégulation de certains mécanismes épigénétiques sont à l'origine de surexpression ou activation de certains oncogènes, ou au contraire d'inhibition de gènes suppresseurs de tumeur.

#### **1. Organisation de la chromatine**

Dans chacune de nos cellules est contenu de l'ADN, riche d'environ 3 milliards de paires de bases et long de 2 mètres de long. Un système de compactage associe l'ADN à des protéines structurales et forme la chromatine. L'ADN s'enroule autour de nucléosomes, ce sont des complexes formés de 8 sous-unités d'histones qui se constitue de 2 dimères H2A, H2B et d'un tétramère (H3-H4)(H3-H4). La chromatine prend une structure spatiale en fonction du temps, du stade de division cellulaire et des caractéristiques propres aux cellules. La chromatine peut être organisée en régions condensées « l'hétérochromatine » ou décondensée « l'euchromatine ».

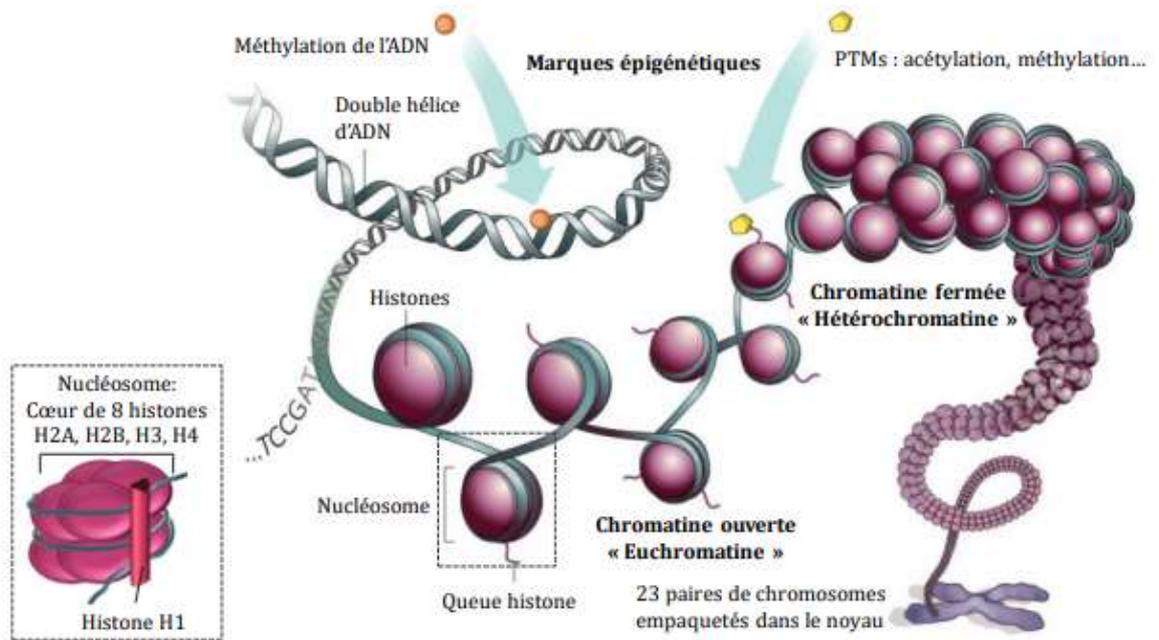


Figure 3 : schéma représentant l'organisation de la chromatine, figure adaptée du schéma de Marx et al (Nature, 2012)<sup>22</sup>

## 2. Mécanismes de la régulation épigénétique

Il existe 3 principales voies de régulations de l'épigénétique dans la cellule : la méthylation des îlots CpG de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones et la régulation de la transcription des gènes par les micro-ARNs non codants. Les micro-ARNs non codants ne sont pas le sujet de ce travail et ne seront pas détaillés.

### - Méthylation directe de l'ADN

La méthylation de l'ADN est le premier mécanisme épigénétique décrit, il permet à une cellule d'inhiber l'expression de certains gènes. Cette méthylation consiste en l'ajout d'un groupement -CH<sub>3</sub> sur les cytosines de dinucléotides CpG. Certaines régions du génome sont particulièrement riches en CpG, ce sont les îlots CpG et sont souvent situés au niveau de la partie promotrice des gènes. Ces régions du génome sont non codantes et permettent de réguler l'expression des gènes. La réaction de méthylation des cytosines est réalisée par des ADN méthyltransférases (DNMTs), principalement DNMT1, DNMT3a et DNMT3b.

### - Modifications post-traductionnelles des histones

Les modifications post-traductionnelles des histones sont réparties en deux groupes selon la taille du groupement qui s'ajoute aux histones. Les modifications chimiques de petites tailles sont l'acétylation, la méthylation (mono, di ou triméthylation), la phosphorylation et la citrullination. Les modifications chimiques de grande taille sont l'ubiquitinylation, la SUMOylation, la ribosylation... La cible de ces modifications sont des acides aminés constituant les histones, le plus souvent au niveau de la queue N-terminale et plus rarement dans la partie C-terminale ou le domaine globulaire et concernent les résidus lysine, arginine, sérine, thréonine ou tyrosine.

Toutes les modifications post-traductionnelles forment le « code histone » qui dicte à la chromatine sa structure spatiale (plus ou moins condensée), et sa manière de réguler les gènes. Ce code est mis en place par les « writers » et les « erasers ». Les « writers » sont les enzymes qui catalysent la formation des groupements méthyl (HMT, histone MéthylTransférase) et Acetyl (HAT, Histone AcétylTransférase) sur les histones. Les « erasers » sont les enzymes qui enlèvent les groupements acétyl (HDAC (Histone DéAcétylase) et méthyl (HDM, Histones Déméthylases).

Ensuite, ce « code histone » est lu par des protéines régulatrices, les « readers », qui traduisent les marques épigénétiques en éléments régulateurs de la transcription de l'ADN. Un exemple de « readers » sont les protéines à bromodomaines qui se fixent à l'ADN via les lysines acétylées présentes au niveau de la queue des histones, régulant ainsi la transcription de l'ADN.

Les marques épigénétiques que nous détaillerons dans ce travail sont l'acétylation et la méthylation des histones.

#### La méthylation des histones :

Le méthyl est ajouté par les histones méthyltransférases (HMT) au niveau des lysines et arginines. Elles peuvent être mono-, di- ou tri- méthylées sur les lysines et mono- ou di-méthylées sur les arginines. On parle de 2 catégories de HMT, les Protéines Arginine Méthyltransférases (PRMT) qui méthylent les arginines et les Protéines Lysines Méthyltransférases (PKMT) qui méthylent les lysines. Ces deux enzymes utilisent le même substrat, la S-adénosyl méthionine pour le transfert du groupement méthyl sur le résidu. Plus de 100 HMT et KMT ont été identifiées, avec des structures, fonctions biologiques, et implications dans les pathologies distinctes. La méthylation est une marque épigénétique complexe car la méthylation d'une même protéine peut avoir des effets opposés selon le résidu méthylé. Par exemple, la méthylation de la lysine 9 de H3 (H3K9me) est associée à une répression de la transcription alors que la méthylation de la lysine 4 de H3 (H3K4me) est associée à une activation de la transcription.

La méthylation était initialement considérée comme irréversible. Puis a été découverte, en 2004, la première lysine déméthylase (LSD1)<sup>23</sup> puis une arginine déméthylase, la JMJD6, en 2009<sup>24</sup>.

### L'acétylation des histones :

L'acétylation des histones est l'ajout du groupe acétyle -COCH<sub>3</sub> sur le groupement ε-aminé d'un résidu lysine. Cette réaction est réalisée par des enzymes appartenant à la famille des Histones AcétylTransférases (HAT) à partir d'une molécule d'acétyl-coenzyme A. Il existe quatre familles de HAT : les GNAT (GCN5-N-Acetyltransferaserelated), la superfamille CBP/p300, la superfamille MYST et la superfamille SRC (Steroid Receptor Coactivator). La réaction inverse est catalysée par des enzymes appartenant à la famille des histone-désacétylases (HDAC). Le niveau global d'acétylation des histones est ainsi la résultante de l'équilibre entre HAT et HDAC.

Contrairement à la méthylation qui a un code complexe, l'acétylation est considérée comme une marque d'activation de la transcription. En effet, l'ajout d'un groupement acétyl diminue les interactions électrostatiques entre les histones chargés positivement et l'ADN chargé négativement et augmente la taille de la chaîne latérale de l'histone. Par conséquent la chromatine est décondensée, il y a une augmentation de la transcription de l'ADN.

### **b) Les épidrogues**

Les marques épigénétiques étant par définition réversibles, il est possible de corriger ces dernières. Cette idée a conduit à l'émergence des épidrogues ou épithérapies. Ces molécules ont pour but de moduler les dérégulations épigénétiques et d'éliminer les marques épigénétiques anormales.

Les principales familles de molécules développées jusqu'alors sont

- Les inhibiteurs des ADN méthyltransférases (DNMTi) qui inhibent la méthylation de l'ADN
- Les inhibiteurs des déacétylases d'histone (HDACi) qui restaurent l'acétylation des histones
- Les inhibiteurs de bromodomaines (BRDi) qui inhibent les protéines à bromodomaines BET

#### 1. Les protéines à bromodomaines, cibles des BRDi

Les BET sont des protéines sont des « readers », elles régulent la transcription de l'ADN en se fixant sur les lysines ε-N-acétylées présentes au niveau de la queue des histones. Le génome humain code pour 42 protéines à bromodomaines différentes. La famille BET « Bromo et Extra Terminal domain » comprend 4 membres : BRD2, BRD3, BRD4 et BRDT. La protéine BRDT (Bromodomain Testis specific) est retrouvée spécifiquement dans le testicule et ne sera pas abordée dans ce manuscrit. Les

protéines BRD2, BRD3 et BRD4 sont retrouvées de manière ubiquitaire dans l'organisme, leurs principales fonctions sont la régulation de la transcription de l'ADN et à moindre niveau le remodelage de la chromatine. Les BET se lient aux lysines acétylées situées au niveau de la queue N-terminale des histones grâce à 2 bromodomains BD1 et BD2 qui possèdent une poche hydrophobe ayant une forte affinité pour les lysines acétylées, de nature elles aussi hydrophobes. Ce phénomène est décrit au niveau de promoteurs régulant le gène en aval, ainsi qu'à des enhancers, permettant une régulation longue distance de gènes. Il a été démontré une quantité très importante de fixation des protéines BET au niveau de régions particulières, les « super-enhancers », qui régulent de nombreuses cibles cellulaires et certains oncogènes.<sup>25</sup> Lovén et al ont trouvé que 40% des sites de liaisons du BRD4 s'effectuent au niveau de ces super-enhancers.

BRD4 est la protéine la plus étudiée de la littérature. Elle interagit avec un grand nombre de facteurs de transcription (GATA1...), facteurs de réplifications (replication factors C RFC1, RFC2, RFC3), et régulateurs épigénétiques (par exemple JNJD6 est une déméthylase qui élimine des marques répressives de la chromatine) et la NSD3 (histone lysine N-méthyltransferase) qui appose la marque activatrice H3K36me3) ... BRD4 recrute également P-TEFb (positive transcription elongation factor b), qui permet de lever la pause de la transcription par l'ARN polymérase II.<sup>26</sup> BRD4 est une kinase atypique car elle possède plusieurs motifs kinases dispersés, et pourrait avoir une activité de phosphorylation directe du domaine C terminal (au niveau de la ser2) de l'activité polymérase<sup>27</sup>.

Les deux autres membres des BET sont relativement moins étudiés dans les leucémies, même si leurs rôles commencent à être élucidés. Par exemple, BRD2 se lie aux facteurs de transcription E2F2 et GATA1<sup>28</sup> pour stimuler la transcription de l'ADN ; BRD3 se lie également à GATA1, facteur essentiel à l'hématopoïèse. BRD2 et BRD3 facilitent la transcription en rendant plus permissives la chromatine au passage de l'ARN polymérase II<sup>29</sup>.

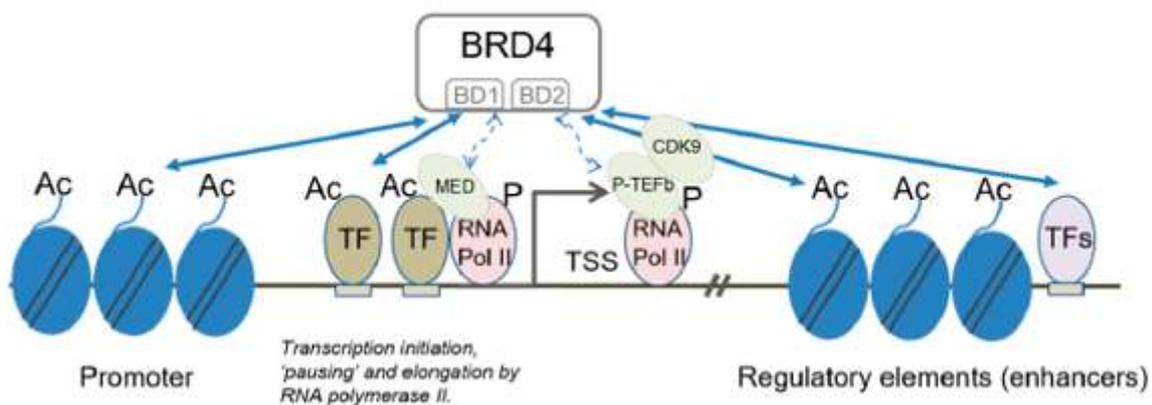


Figure 4 : représentation schématique des fonctions régulatrices de BRD4<sup>30</sup>

## 2. Les inhibiteurs de bromodomains (BRDi)

Les inhibiteurs des bromodomains (BRDi) sont des petites molécules qui inhibent par compétition les protéines des bromodomains (BET) dont font partie BRD2, BRD3 et BRD4. L'insertion des BRDi au niveau de la poche hydrophobe des bromodomains empêche la fixation des BET sur les lysines acétylées des histones et bloque leur activité. Les BET ne peuvent ainsi plus jouer leur rôle de facteur de transcription et de régulation de l'ADN. Les BRDi sont actifs à de faibles concentrations, ceux commercialisés à ce jour sont pan-BET, ils se lient aux 3 protéines à bromodomains (BRD2, BRD3 et BRD4) sans sélectivité particulière, mais des BRDi sélectifs sont à l'étude tels qu'au sein du CRCM, la molécule CRCM5464, spécifique du BD1 de BRD4, ou bien le ABBV-744, sélectif pour le domaine BD2 des BET qui a fait l'objet d'une publication dans Nature en 2020 <sup>31</sup>.

Depuis 2010, notamment avec la découverte de l'inhibiteur pan-BET JQ1, les études sont publiées de manière exponentielle, développant les propriétés anti-cancéreuses de ces petites molécules. Des essais cliniques sont notamment en cours pour étudier la tolérance, la pharmacocinétique, la pharmacodynamique en onco-hématologie dans le cadre de la LAM réfractaire, syndrome myélodysplasique, myélome multiple et lymphomes, mais aussi dans certains cancers solides, dont le cancer du sein à petites cellules triple négatif, le cancer de la prostate, le cancer colorectal, le neuroblastome et des tumeurs solides induites par Myc. <sup>32</sup>

Leur activité antiproliférative pour les cellules tumorales a été démontrée dans de nombreux cancers. Ces molécules ont démontré une certaine sélectivité pour le cancer alors que cette protéine est omniprésente dans l'organisme et elle n'est pas impliquée dans la tumorigénèse. Dans le cas des patients LAL-B Ph-like avec ces rares réarrangements, ces molécules ont une action sur les voies de signalisations en aval de la kinase (Liu et al, 2014) <sup>33</sup>. Depuis 2011 a été mise en évidence l'implication de l'oncogène Myc. <sup>34 35 36</sup>

L'étude des molécules anticancéreuses de mon travail inclut 2 BRDi pan-BET : OTX015 et JQ1.

### Une action préférentielle des BRDi sur l'oncogène Myc et sur l'activateur de transcription STAT5.

Myc est un oncogène dont la surexpression est observée dans de nombreux cancers. Les réarrangements impliquant Myc aboutissent le plus souvent à la surexpression de Myc, qui contribue à la leucémogénèse et implique un plus sombre pronostic. Il n'existe à ce jour pas d'anticancéreux qui ciblent directement Myc.

Les BRDi permettent de manière indirecte par modulation de l'épigénétique d'abroger de manière rapide et puissante la transcription du gène Myc<sup>37</sup>. En 2011, Mertz et al. ont montré que la suppression de l'expression de Myc engendrée par JQ1 était accompagnée d'une réactivation puissante du gène suppresseur de tumeur p21.<sup>38</sup> Dans l'autre sens, le statut mutationnel de Myc impactait aussi sur la sensibilité aux BRDi. En 2017, Bian et al ont publié une étude sur 55 PDX de cancers du pancréas et ont déduit que l'expression exacerbée de Myc était significativement associée à une sensibilité augmentée à JQ1<sup>39</sup> Ces observations biologiques ont permis la découverte de régions super-enhancers qui régulent de manière importante les oncogènes, dont Myc.

Le transducteur de signal et activateur de la transcription STAT5 est une protéine impliquée dans la signalisation cytosolique et dans la médiation de l'expression de nombreux gènes. Dans la LAL-B Ph<sup>+</sup> et les LAL-B Ph-like impliquant la kinase Abl1, STAT5 est suractivé, provoquant une prolifération et une survie accrue des cellules cancéreuses. Certains mécanismes d'activation de STAT5 par BCR-Abl1 sont à ce jour identifiés. STAT5 peut être activée via JAK2, via des kinases de la famille des Src<sup>40</sup>, ou encore de manière directe par liaison de STAT5 au domaine SH2 de BCR-Abl1<sup>41</sup>.

Des expériences, réalisées par Liu et al en 2014 montrent que l'inhibition des protéines à bromodomaines par JQ1 entraîne une diminution de l'expression et des fonctions de STAT5 dans les cellules leucémiques et lymphomateuses.<sup>33</sup>

Comme vu plus dans le chapitre précédent, en 2017, Elsa Drivet a réalisé des expériences au sein du CRCM montrant que RCSD1-Abl1 induit une hyperphosphorylation de STAT5, supérieure à celle observée avec BCR-Abl1. Cette piste incite à prêter une attention particulière sur l'efficacité de JQ1 et OTX015 pour les patients LAL-B RCSD1-Abl1.

### **C) Problématique et objectifs**

L'étude de l'épigénétique est complexe en pratique clinique car les techniques actuelles de l'épigénétiques (CHIP-seq) demandent du temps et beaucoup de matériel biologique. Nous cherchons à développer une nouvelle méthodologie d'étude performante de l'épigénétique applicable sur des cellules leucémiques de patients, pour étudier notamment les maladies très rares telles que la LAL-B avec transcrit de fusion RCSD1-Abl1 et pour lesquelles le matériel biologique est précieux et en quantité limitée.

Le premier objectif de mon travail est de réaliser et de comparer les profils de sensibilité/résistance aux drogues dans différents types de LAB-B (avec transcrit de fusion RCSD1-Abl1, BCR-Abl1 et autres LAL-B n'ayant pas de transcrit de fusion impliquant Abl1), avec une attention particulière sur les BRDi.

L'objectif suivant est de mettre au point un nouvel outil d'analyse non-supervisée de l'épigénétique des cellules afin de relier les profils de sensibilité/résistance obtenus à des profils épigénétiques des cancers. A terme, ce nouvel outil permettra d'établir une cartographie des marques épigénétiques au sein des cellules leucémiques et de relier certaines signatures épigénétiques (méthylation, acétylation des histones...) à des profils de sensibilité ou de résistance à des drogues.

Pour atteindre ces 2 objectifs, nous avons dans un premier temps réalisé des profils de sensibilité/résistance de 13 échantillons sur un panel de 79 agents anti-cancéreux. Nous avons porté une attention particulière aux patients porteurs du transcrit de fusion RCSD1-Abl1 (LALB-1, LALB-2 et LALB-3) (seuls quelques cas ont été décrits dans le monde, ce qui rend l'accès à ces échantillons particulièrement original et précieux), et nous les avons comparés aux patients porteurs du transcrit de fusion BCR-Abl1 et aux patients n'exprimant pas de produits de fusion d'Abl1.

Dans un second temps, nous avons établis le profil épigénétique de ces échantillons en utilisant la technologie innovante du « CUT and RUN », décrite en 2017 par Henikoff et al.

## **2) MATERIELS ET METHODES**

### **a) Sélection des patients et matériel biologique**

Le matériel biologique de mon étude est issu de 10 patients, tous atteints de LAL-B. Pour 3 patients nous avons pu inclure les cellules du diagnostic et de la rechute (Tableau 1). Nous avons étudié au total 13 échantillons. Tous nos échantillons sont des PDX (Patient-Derived Xenograft), obtenus par xénogreffes à partir des cellules primaires des patients (cf 'utilisation du modèle murin'). Les caractéristiques des patients, les anomalies cytogénétiques et l'histoire de la maladie sont récapitulées dans le Tableau 1.

Trois patients de notre cohorte présentent une LAL-B Ph-like très rare, caractérisée par le réarrangement RCSD1-Abl1.

- LALB-1 est une patiente qui a été diagnostiquée LAL-B RCSD1-Abl1 à l'IPC en 2012 (Collette et al, 2015). Cette patiente a été prélevée au moment du diagnostic (Septembre 2012) <sup>17</sup>.

L'équipe TrGET a déjà réalisé des études sur cette patiente, et a pu se procurer avant mon arrivée 2 autres patients LAL-B porteurs du transcrite de fusion RCSD1-Abl1:

- LALB-2 a été prélevée le 2 juillet 2013 à l'hôpital de Marburg suite à sa première rechute (Frech et al, 2016). Cet échantillon a été généreusement offert par le Dr Lutz Jhen du département de médecine interne et d'hématologie de l'hôpital de Marburg <sup>19</sup>.

- LALB-3 a été prélevé le 1er Novembre 2001 à Vienne avant la rechute (Perwein et al, 2016). Cet échantillon a été généreusement offert par le Pr Oskar Haas du Children's Cancer Research Institute de Vienne <sup>20</sup>.

Quatre échantillons nous ont été offerts par l'équipe du CRCM de Stéphane Mansini. Trois de ces échantillons (LALB-4, LALB-5 et LALB-6) sont issus de patients atteints de LAL-B Ph+, présentant le transcrite de fusion BCR-Abl1 ; et un échantillon issu d'un patient LAL-B Ph- (LALB-7).

Six échantillons proviennent de 3 patients atteints de LAL-B, hospitalisés à la Timone dans le service d'onco-hématologie pédiatrique du Pr Gérard Michel. Le Pr Michel a donné son accord pour réaliser des expériences sur ces prélèvements et des consentements autorisant la recherche ont été signés.

Six prélèvements sont issus de ces trois patients pédiatriques de la Timone, un au diagnostic (D) et un à la rechute (R) :

- LALB-8D, LALB-8R
- LALB-9D, LALB-9R
- LALB-10D, LALB-10R

Identité	RCSD1			SM Ph+			Ph-
	LALB-1	LALB-2	LALB-3	LALB-4	LALB-5	LALB-6	LALB-7
anomalie cytogénétique	RCSD1-Abi1	RCSD1-Abi1	RCSD1-Abi1	BCR-Abi1	BCR-Abi1	BCR-Abi1	Ph-(82)/46, XY, ADD(21)(Q22)(4)/46, XY[21]
date du diagnostic	Septembre 2012	Aout 2012	Avril 2001	02/01/2006	12/05/2005	25/03/2013	12/02/2008
sexe (H/F)	F	F	H	H	F	F	H
âge au diagnostic (années)	26	61	15	26	48	57	23
% blastes au diag	84% (26G/L de GB)	2% sang (2,5G/L de GB) / 70% MO	71% (68,7G/L de GB)	88% MO (397 GB)	92% MO (80.8 GB)	NR (66 GB)	91% MO (7.1 GB)
date de rechute	(1) Décembre 2013 (2) Avril 2014 (3) Octobre 2014	01/04/2013	01/07/2004	04/07/2006	non	non	non
date du prélèvement	Septembre 2012	Juillet 2013	1er Novembre 2001	NR (avant la rechute)	NR	NR	NR

pédiatriques Timone			
Identité	LALB-8 : LALB-8D et LALB-8R	LALB-9 : LALB-9D et LALB-9R	LALB-10 : LALB-10D et LALB-10R
anomalie cytogénétique	RAS	TEL-AML1	TEL-AML1
date du diagnostic	20/06/2003	07/06/2006	04/12/2010
sexe (H/F)	F	H	F
âge au diagnostic (années)	2,5	2,6	4,2
% blastes au diag	63% (27G/L de GB)	NR	86% (51G/L de GB)
date de rechute	10/11/2004	06/11/2009	05/01/2015
date du prélèvement	diagnostic + rechute	diagnostic + rechute	diagnostic + rechute

Tableau 1 : caractéristiques des patients LAL-B, et histoire de la maladie (diagnostic, rechute)

## **b) Utilisation du modèle murin**

Tous les échantillons de mon Mémoire sont issus de PDX (Patient-Derived Xenograft), obtenus à partir de cellules primaires des patients. Le matériel mis à ma disposition a été généré avant mon arrivée puis congelé dans l'azote liquide.

Les cellules primaires du patient (P0) ont été analysées dans les laboratoires hospitaliers (cytologie, cytométrie en flux, biologie moléculaire et caryotype). Elles ont ensuite été envoyées puis analysées au sein du Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM) (profils de sensibilité/résistance aux drogues, analyses protéomiques, génomiques...). Les expérimentations animales sont réalisées par

la plateforme d'essai préclinique TrGET CRCM. Les souris utilisées sont des souris NOD scid gamma mouse (NSG), issues de la lignée NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ. Tous les protocoles ont été effectués en accord avec les directives françaises pour la manipulation des animaux et ont été approuvés par le comité éthique local. Ce modèle est couramment utilisé et très bien documenté dans la littérature dans le cadre d'études précliniques réalisées à partir de xénogreffes de cellules leucémiques humaines.<sup>42</sup> La mutation Prkdcscid est responsable de l'absence de lymphocytes B, T et NK matures, la forte immunosuppression engendrée facilite la prise de la greffe. Le but de la xénogreffe est de décupler le matériel biologique de départ.

Les cellules primaires des 10 patients à l'étude ont été xénogreffées aux souris NGS. Les souris sont préalablement irradiées puis mises sous antibioprophylaxie. 1 million de cellules leucémiques sont reprises dans 100µL de PBS, puis injectées dans la veine caudale de la souris. L'état physiologique global des souris est contrôlé quotidiennement, et un suivi de l'expansion des blastes leucémiques avec les marqueurs de surface hCD45+ hCD19+ est réalisé par cytométrie en flux sur le sang des souris. Lorsque le taux de blastes sanguin atteint une valeur suffisante (>300 blastes/µL de sang), les cellules de la moelle osseuse et de la rate sont prélevées et congelées à l'azote liquide dans du SVF+10%DMSO.

### **c) profils de sensibilité/résistance aux drogues**

La réalisation d'un profil de sensibilité/résistance aux drogues permet d'étudier la sensibilité des cellules du patient (P0) et des PDX à un panel de 79 composés anti-tumoraux. Cette stratégie permet un criblage étendu sur 79 molécules en cours d'étude préclinique ou ayant une activité prouvée dans les domaines de l'hématologie et de l'oncologie. Les cellules des patients sont mises en contact avec la drogue, sous 4 concentrations connues, croissantes et séparées d'un log, pendant 48 heures. Chaque gamme de drogue est réalisée en monoplicat.

#### **Protocole :**

- Décongélation et comptage et ensemencement des cellules :

Toutes les cellules utilisées sont conservées dans des ampoules dans l'azote liquide. L'ampoule est décongelée au bain marie à 37°C puis les cellules sont rapidement reprises dans du RPMI + 20% FCS (environ 10mL de milieu pour 10 à 20 millions de cellules). Les cellules sont colorées à l'acridine orange. 2µL d'acridine orange sont ajoutées à 18µL de RPMI-20%FCS contenant les cellules. Les

cellules vivantes sont détectées et comptées avec un Luna cell counter. Ce dernier prend en compte la dilution avec l'acridine orange.

Les cellules sont déposées dans des plaques à 96 puits à parois blanches et fonds transparents (Corning). Dans chaque puits sont déposées 20 000 cellules dans 75µL de RPMI+20%FCS.

- Préparation des plaques de drogues :

Les plaques 'filles' contiennent les drogues sur des plaques 96 puits. Elles sont conservées à -80°C et issues d'une dilution de plaques 'mère', de sorte que 1 plaque 'mère' fournisse 60 plaques 'filles'. Elles sont régénérées et diluées au 1/25, extemporanément, par ajout de 120µL RPMI+FCS20%. La concentration en DMSO est calculée et ajustée pour avoir une concentration en DMSO de 1% par puits.

- Ajout des drogues avec les cellules et incubation :

Les drogues sont diluées au 1/4 dans les puits contenant les cellules : 25µL sont déposés dans chaque puits contenant les cellules, pour un volume final par puits de 100µL. Puis les plaques contenant les cellules et les drogues sont incubées à 37°C pendant 48h.

- Mesure de la viabilité cellulaire à 48h et calcul de l'EC50 :

La viabilité cellulaire est ainsi déterminée à l'aide du kit CellTiter-Glo Luminescent cell viability assay (Promega). Ce kit mesure la quantité d'oxyluciférine, proportionnelle à la quantité de cellules vivantes dans chaque puits. La luciférine oxydée génère la luminescence, quantifiée grâce au luminomètre CentroXS LB 960 (Berthold Technologies) et convertie en RLU (Relative Light Unit).

Cette valeur est ensuite convertie en EC50, ou concentration médiane efficace, représente la concentration pour laquelle la viabilité cellulaire est diminuée de 50% (figure 5). Les valeurs de RLU sont normalisées à partir des puits contrôles sans drogue. L'EC50 est déterminée grâce au logiciel GraphPade Prism et à partir de la formule ci-dessous (Figure 5).

$$Y = \frac{\text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom})}{1 + 10^{((\text{LogIC50} - X) \times \text{Hill Slope})}}$$

Avec :

Y, le pourcentage de viabilité

X, la concentration en drogue

Bottom, le minimum de l'effet du composé, fixé à 100% (RLU normalisées)

Top est l'effet maximum du composé

Hill Slope est la pente de la droite

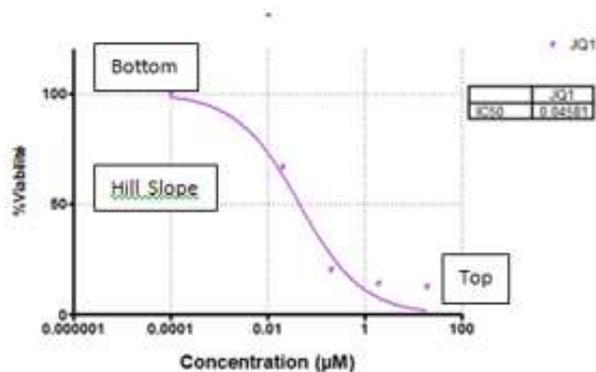


Figure 5 : représentation de la courbe permettant de déterminer l'EC50 de JQ1 pour LALB-1

#### **d) étude épigénétique : Le CUT& RUN**

Le CUT& RUN (Cleavage Under Targets and Release using Nuclease) est une stratégie qui permet de mettre en évidence des profils épigénétiques de l'ADN et des facteurs de transcriptions associés à l'ADN. Cette méthode remplace le ChIP-seq qui ne donnait pas de résultats satisfaisant avec les anticorps utilisés. Le CUT & RUN présente par rapport au ChIP-seq plusieurs avantages :

- Il permet de travailler sur une chromatine native, contrairement au CHIP-seq qui fixe la chromatine avec du formaldéhyde puis la cisaille par sonication avec des ultra-sons.
- le CUN and RUN est près de trois fois plus rapide à réaliser que le CHIP-seq
- le CUT and RUN permet une meilleure résolution en termes de rapport signal/bruit car il cible une région spécifique de l'ADN
- Le CUT & RUN demande moins de matériel biologique, 100 cellules pourraient suffire, contre environ 5 millions pour le ChIP-seq. <sup>43</sup>

Le protocole du CUT & RUN a été décrit en 2017 dans eLife<sup>44</sup> puis en 2018 dans Nature Protocols<sup>45</sup> par l'équipe de Henikoff du Fred Hutchinson Cancer Research Center de Washington.

Le protocole que nous utilisons est celui publié en 2017 dans eLife. Le principe de cette méthode (schématisé sur la figure 6) est de cliver l'ADN de manière très ciblée à l'aide d'une nucléase, puis de récupérer l'ADN d'intérêt pour le séquençage, après l'élaboration d'une librairie. Une analyse bio-

informatique permet ensuite de déterminer dans quelles régions de l'ADN sont présentes les protéines interagissant avec l'ADN, facteurs de transcriptions et marques épigénétiques.

Les cellules sont décongelées puis comptées suivant le protocole décrit ci-dessus (figure 6). Nous utilisons 1 million de cellules par anticorps testé, donc 4 millions de cellules par échantillon.

Dans un premier temps, les cellules sont lavées avec un Wash buffer (HEPES 0,02M, NaCl 0,15M, de la spermidine, BSA 0,5% et inhibiteurs de protéases). La spermidine qui permet de tuer la cellule tout en conservant une viabilité cellulaire.

Les billes de concanavaleine A sont des billes magnétiques sur lesquelles se fixent les cellules. Un support magnétique permet de réaliser les différentes étapes de lavage. Les billes sont activées et reprises dans du binding buffer (HEPES 0,02M, KCL 0,01M, CaCl<sub>2</sub> 0,001M et MnCl<sub>2</sub> 0,001M). Les anticorps utilisés sont anti-BDR4, les anticorps spécifiques des marques d'acétylation et de méthylation de l'histone H3 : H3K27ac et H3K27me<sub>3</sub>, ainsi qu'un contrôle négatif : anti-IgG1. Ils sont repris dans du Dig Wash buffer (constitué du Wash buffer restant + digitonine 0,1%) et EDTA 0,5M. Les mix d'anticorps sont ajoutés à l'échantillon puis incubés sous agitation pendant 1h.

L'échantillon est ensuite lavé à 2 reprises pour éliminer l'excès d'anticorps. Puis est ajoutée la protéine de fusion ProtéineA-MNase. La protéine A reconnaît et se fixe sur les anticorps et la MNase clive l'ADN d'intérêt, sous sa forme de double brin, de part et d'autre de la fixation de l'anticorps. La MNase, calcium-dépendante, est activée par addition de CaCl<sub>2</sub> 100mM. L'incubation est de 30 minutes à 0°C, puis la réaction est arrêtée par l'ajout du tampon stop qui chélate le calcium (NaCl 0,34M, EDTA 0,02M, EGTA 0,004M, digitonin et RNase). Le complexe ADN-protéine de fusion diffuse hors de la cellule puis le surnageant le contenant est récupéré L'ADN est ensuite purifié et extrait à l'aide du kit Quiagen. L'éluat final est de 25µL. 4µL sont utilisés le jour du CUT & RUN pour vérifier l'expérience, et les 21µL restant serviront à la préparation de la librairie pour le séquençage.

La qualité des échantillons obtenus en CUT and RUN est réalisée le jour même par PCR quantitative en temps réel (qPCR) avec le CTX96 Real Time System (BioRad), utilisant 2 amorces : GAPDH et HOXD11 et un rapporteur fluorescent, l'intercalant d'ADN SYBR green Mix.

#### Préparation de la librairie en vue du séquençage :

La préparation des banques d'ADN a pour but de préparer les échantillons issus du CUT and RUN pour le séquençage. Elle se fait à l'aide du kit Diagenode microplex librairie prep et utilise le 96 Well Thermal Cycler de Applied Biosystems. Les librairies sont réalisées pour 12 échantillons à la fois (soit

3 patients). 3 étapes sont à réalisées, elles consistent à ajouter des mix de réactifs puis d'incuber les préparations au Thermo cycler.

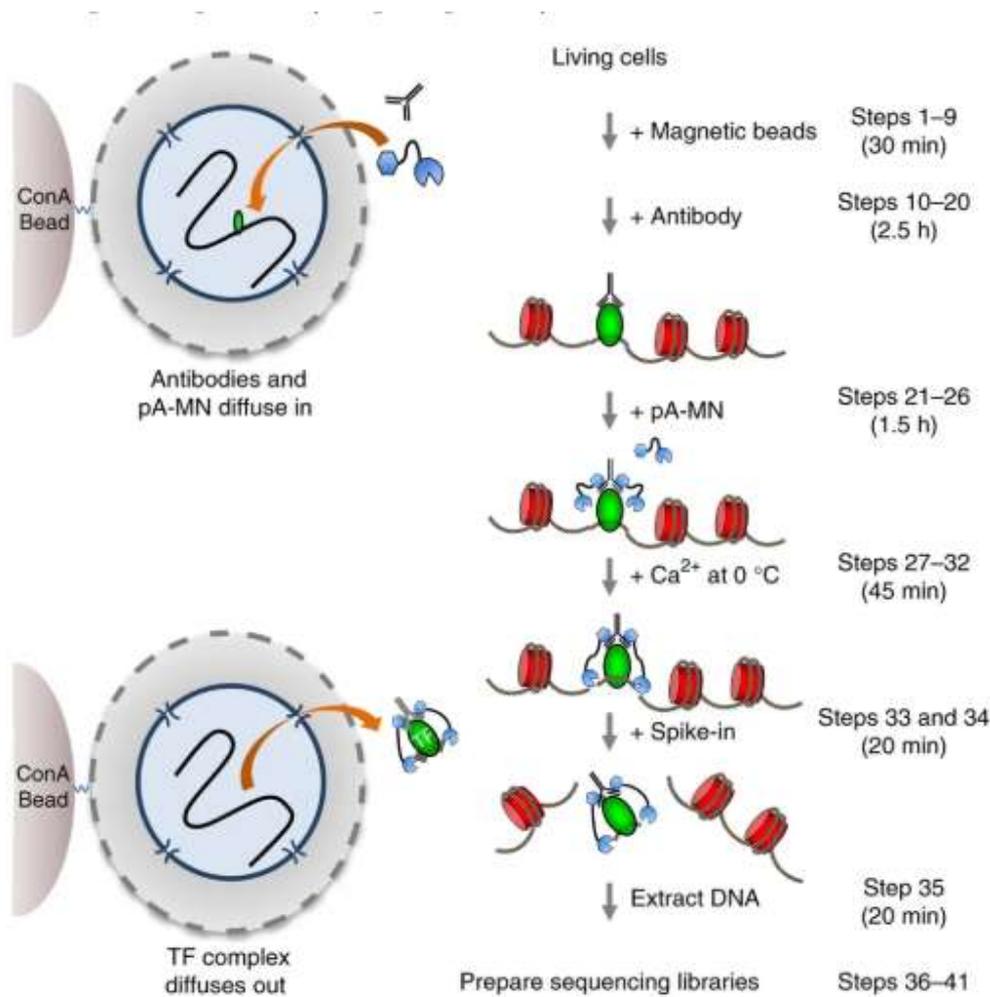


Figure 6 : Schéma explicatif des étapes du CUT and RUN (Henikoff et al, 2018) <sup>45</sup>

Les cellules sont régénérées puis liées à des billes concanavaline A, en présence de digitonine qui perméabilise les cellules. Les anticorps spécifiques pénètrent jusqu'aux brins d'ADN où ils fixent leurs cibles (marques épigénétiques ou protéines liées à l'ADN). Après incubation des anticorps puis lavage, les cellules sont incubées avec la pA-Mnase (en présence de Ca<sup>2+</sup> à 0°) qui clive les segments d'ADN

d'intérêt. La réaction est arrêtée par chélation du calcium. L'ADN est libéré dans le surnageant puis extrait.

La quantification de l'ADN est réalisée avec le Qubit. 1,5 ng d'ADN sont prélevés et ajustés dans un volume de 10 $\mu$ L.

La première étape permet de réparer l'ADN, le double brin d'ADN est ainsi clivé et réparé pour obtenir des extrémités franches.

La seconde étape permet l'association à l'extrémité des doubles brins d'adaptateurs brevetés MicroPlex permettant la fixation des barcodes lorsqu'ils sont clivés. Ce sont des adaptateurs tige-boucle, ligaturés à l'extrémité 3' et ils sont compatibles avec les automates NGS Illumina.

La dernière étape repose le clivage des adaptateurs puis l'ajout des index barcodes et enfin l'amplification des brins d'ADN. Les barcodes permettent d'individualiser chaque patient pour permettre l'identification lors de l'analyse bio-informatique.

L'ADN est ensuite purifié avec les billes AMPure XP par size sélection en présence d'éthanol, puis l'ADN purifié se fixe sur les billes et est récupéré dans 12,5 $\mu$ L d'eau.

#### Tapestation :

La Tapestation est un système d'électrophorèse capillaire (Agilent) qui permet d'avoir une mesure précise de la taille des brins d'ADN contenus dans nos échantillons et une estimation des concentrations (pg/ $\mu$ L et pM).

#### Séquençage :

Le séquençage est réalisé avec le Illumina NextSeq500. Les échantillons analysés sont ajustés à une concentration de 4nM. La quantification précise de l'ADN est réalisée grâce au Qu-bit (technique fluorimétrique).

#### e) étude de l'expression des gènes par qRT-PCR (reverse transcription PCR quantitative)

La qRT-PCR permet d'étudier les ARNm transcrits dans les cellules des 13 échantillons.

Les matériaux biologiques étudiés sont des culots secs de cellules conservées au -80°C. Les culots secs contenant 1,5 à 4 millions de cellules sont utilisés.

Lyse des cellules et extraction de l'ARN :

Les cellules sont lysées par une solution de  $\beta$ -mercaptoéthanol 1% pendant au moins 30 minutes, à -80°C. La solution de lyse est obtenue par dilution au 1/100 de la solution de  $\beta$ -mercaptoéthanol dans du buffer RLT plus. 350 $\mu$ L de solution de lyse sont à ajouter pour 2 millions de cellules.

Le kit utilisé pour extraire l'ARN est le RNeasy® plus Mini Kit (quiagen). Ce kit a l'intérêt d'être sélectif vis-à-vis de l'ARN. Une première colonne (gDNA eliminator column) piège l'ADN génomique. La seconde colonne (RNeasy spin column) retient l'ARN. Cette dernière est lavée puis l'ARN est récupéré dans 30 $\mu$ L de RNase free water. La qualité et la quantité de l'extrait d'ARN obtenu sont évaluées par spectrophotométrie dans l'UV avec le DropOne (Thermoscientific).

Reverse transcription :

Cette étape permet d'obtenir des brins d'ADN complémentaires (ADNc) à partir de l'ARN extrait. L'ADNc a comme particularité d'être monobrin, et il ne contient pas d'intron ou autres séquences non codantes. Le kit utilisé est le OneScript® plus Reverse Transcriptase (abm). Pour chaque échantillon, une quantité précise d'ARN est ajustée dans un volume final de 29  $\mu$ L de l'eau, allant de 600 à 2000ng, en fonction du matériel quantifié après l'extraction (la limite de ce kit étant de 4000ng d'ADN pour 29 $\mu$ L). Tout d'abord les Random primers et le mix dNTP est ajouté puis incubé 5 minutes à 65°C. Les Random Primers permettent de réaliser une conversion non sélective des ARN, de sorte que tout le matériel sous forme d'ARN soit converti en ADNc. Ensuite l'enzyme OneScript ® Plus est ajoutée et incubée en 50°C pendant 30 minutes. La réaction est stoppée en chauffant 5 minutes à 80°C.

PCR :

Une PCR quantitative en temps réel avec le CTX96 Real Time System (BioRad) est réalisée. Les amorces utilisées sont Myc, BRD2, BRD3, BRD4, HDAC3, HDAC7, HDAC9, BCL2, PLK1, CDK4, CDK6, XIAP, PAK1, *XIOP1* (le gène codant pour CRM1), *TNFRSF1A* (le gène codant pour TNFR1) et Ywhaz. Ywhaz sert de gène de ménage, pour normaliser les résultats. Les 14 autres amorces sont sélectionnées à partir de résultat déjà démontrés dans la littérature associant l'expression de gènes à une sensibilité accrue à certaines drogues (Myc pour les BRDi, TNFR1 pour le birinapant <sup>46</sup>, PAK1 pour le BKM120...) ou bien à partir de leur mécanisme d'action (voie de signalisation, cible...). La quantification est réalisée grâce à l'intercalant d'ADN SYBR green Mix dont le signal fluorescent est proportionnel à la quantité d'ADNc.

Le résultat obtenu pour chaque gène, en Cycle Threshold (Ct), est converti en intensité d'expression relative du gène par rapport au gène contrôle Ywhaz, dont le niveau d'expression ne varie pas d'un échantillon à l'autre.

COMPOSE	FAMILLE		COMPOSE	FAMILLE
17AAG	heat shock protein inhibitor		Lapatinib	EGFR et HER2 inhibitor
AC-4-130	STAT5 SH2 domain inhibitor		Luminespid	HSP90 inhibitor
Afatinib	EGFR/HER2 inhibitor		Mastinib	c-kit PDGF inhibitor
AG-221	IHD2 inhibitor		Metformin	AMPK activation, inhibition mTOR...
AGI-5198	IHD1 inhibitor		Midostaurin	anti FLT3, multi target TK inhibitor
Alisertib	Aurora A inhibitor		MK2206	Pan-Akt inhibitor
AraC	Antimetabolite		Navitoclax	anti BCL2
Arsenic	Degradation PML/RARA		Nelarabine	Purine analog
Asparaginase	asparagine depletion		Nilotinib	BCR ABL kinase inhibitor
AT9283	JAK 2/3 inhibitor , Aurora A/B, Ab(T3151)		Nutlin 3	p53/ MDM2 inhibitor
Azacitidine	DNA methylation inhibitor		Olaparid	PARP inhibitor
Birinipant	XIAP cIAP inhibitor		OTX015	BET bromodomain inhibitor
BKM120	PAN-PI3K inhibitor		Palbociclib	CDK4/6 inhibitor
Bleomycine	DNA damage		Panobinostat	HDACi
Bortezomib	proteasom inhibitor		Ponatinib	multi target BCR ABL kinase inhibitor
Bosutinib	Src/abl inhibitor		Prima1	re activator of mutant p53
Carfilzomib	proteasom inhibitor		Quizartinib	Flt3 inhibitor
Cladribine	Antimetabolite		Regorafenib	VEGFR, Kit, RET Raf-1 inhibitor
Crenolatinib	FLT3/ PDGFR inhibitor		Rigosertib	Plk1 et PI3K inhibitor
Cyclopamine	Smo antagonist		Ruxolitinib	JAK 1/2 inhibitor
Dasatinib	Src , ABL and c-Kit inhibitor		Seliciclib	CDK inhibitor
Daurorubicine	Inhibition topoisomerase II		Selinexor	CRM1 inhibitor
Decitabine	DNA methylation inhibitor		SGI-1027	DNMT inhibitor
DHAP	immunomodulator		SGI-110	DNA hypo methylating agent
Docetaxel	Antimitotique		SGI-1776	PIM, Flt3 inhibitor
Entinostat	HDACi		Sorafenib	Multikinase inhibitor (B-Raf, Raf-1, VEGFR)
EP25676	DOTL1 inhibitor		Sunitinib	TK inhibitor (VEGFR, PDGFR, Kit, Flt3...)
Erlotinib	EGFR, HER2 inhibitor		Temsirolimus	mTOR inhibitor
Etoposide	Inhibition topoisomerase II		Tipifarnib	Farnesyl transeferase inhibitor
Everolimus	mTOR inhibitor		Topotecan	Inhibition topoisomerase I
Gefitinib	EGFR inhibitor		Trametinib	MEK MAPK/Erk Kinase inhibitor
Gilteritinib	FLT3/AXL inhibitor		Tretinoin	ligand fo (RAR) and (RXR) receptor
GSK126	EZH2 inhibitor		Venetoclax	anti BCL2
GSK2879552	LSD1 inhibitor		Vemurafenib	B-Raf inhibitor
Hydroxychloroquine	autophagy		Vincristine	Antimitotique
Idarubicin	Inhibition topoisomerase II		Volasertib	Polo like kinase inhibitor
Idasanutlin	p53/ MDM2 inhibitor		Vorinostat	HDACi
Idelalisib	PI3K		VX680	Aurora inhibitor
Imatinib	v-abl, c-kit, PDGFR inhibitor			

Cibles:
Kinase inhibitor
Epigenetique
Chimiothérapies cytotoxiques
anti BCL2

Tableau 2 : Liste des 79 drogues utilisées pour dresser un profil de sensibilité/résistance aux drogues

### 3) RESULTATS

#### **a) Etude des profils de sensibilité/résistance aux drogues**

J'ai réalisé 13 profils de sensibilité/résistance aux drogues, c'est-à-dire un par échantillon de ma cohorte. Un panel de 79 drogues est testé sur chaque échantillon (voir tableau 2). Ce panel comprend 15 chimiothérapies cytotoxiques pour la plupart utilisées en pratique courante (antimétabolites, antimétabolites, intercalants de l'ADN...), plusieurs inhibiteurs de kinases sont également étudiés (dont les inhibiteurs de la tyrosine kinase BCR-Abl1), ainsi que d'autres thérapies ciblées telles que les anti-Bcl2. Ce panel est également constitué de plusieurs épiprodrogues, parmi elles, les deux BRDi (JQ1 et OTX015), qui ont déjà montré des efficacités remarquables sur certains cancers.

Notre étude porte une attention particulière sur la LAL-B Ph-like avec translocation RCSD1-Abl1. Le patient LALB-1 porteur du transcrite de fusion RCSD1-Abl1 à l'étude dans l'équipe TrGET depuis 2015 a notamment montré des résultats préliminaires de sensibilité accrues à certaines drogues, dont ces 2 BRDi. L'analyse approfondie de cette translocation est possible grâce à la mise à ma disposition à mon arrivée au CRCM des deux PDX de 2 autres échantillons porteurs du transcrite de fusion RCSD1-Abl1 (LALB-2 et LALB-3).

Tout au long de ce manuscrit nous allons comparer le groupe RCSD1, constitué des 3 patients dont la leucémie est associée au transcrite de fusion RCSD1-Abl1 (LALB-1, LALB-2 et LALB-3), avec le groupe BCR constitué des 3 patients avec le transcrite de fusion BCR-Abl1 (LALB-4, LALB-5 et LALB-6) et au groupe non-Abl1 des patients n'exprimant pas ces produits de fusion d'Abl (LALB-7, et les 3 couples diagnostic/rechute LALB-8, LALB-9 et LALB-10).

#### **Analyse globale des profils de réponse : comparaison des valeurs normalisées**

Afin de pouvoir comparer les EC50 obtenues à partir de nos 13 échantillons, les valeurs d'EC50 sont normalisées sous la forme d'un ratio. La valeur d'EC50 obtenue pour chaque patient est divisée par la valeur d'EC50 la plus élevée de la cohorte. Tous les ratios ainsi obtenus sont compris entre 0 et 1. Ils permettent de comparer les sensibilités des différents anticancéreux entre eux de manière individuelle et en les regroupant.

La figure 7 représente le classement des 79 anticancéreux par ordre décroissant d'efficacité, c'est-à-dire par ordre croissant des EC50 du groupe RCSD1-Abl1. Ainsi la 1<sup>ère</sup> molécule en haut est la plus efficace, et les molécules en bas sont les moins efficaces pour le groupe RCSD1-Abl1.

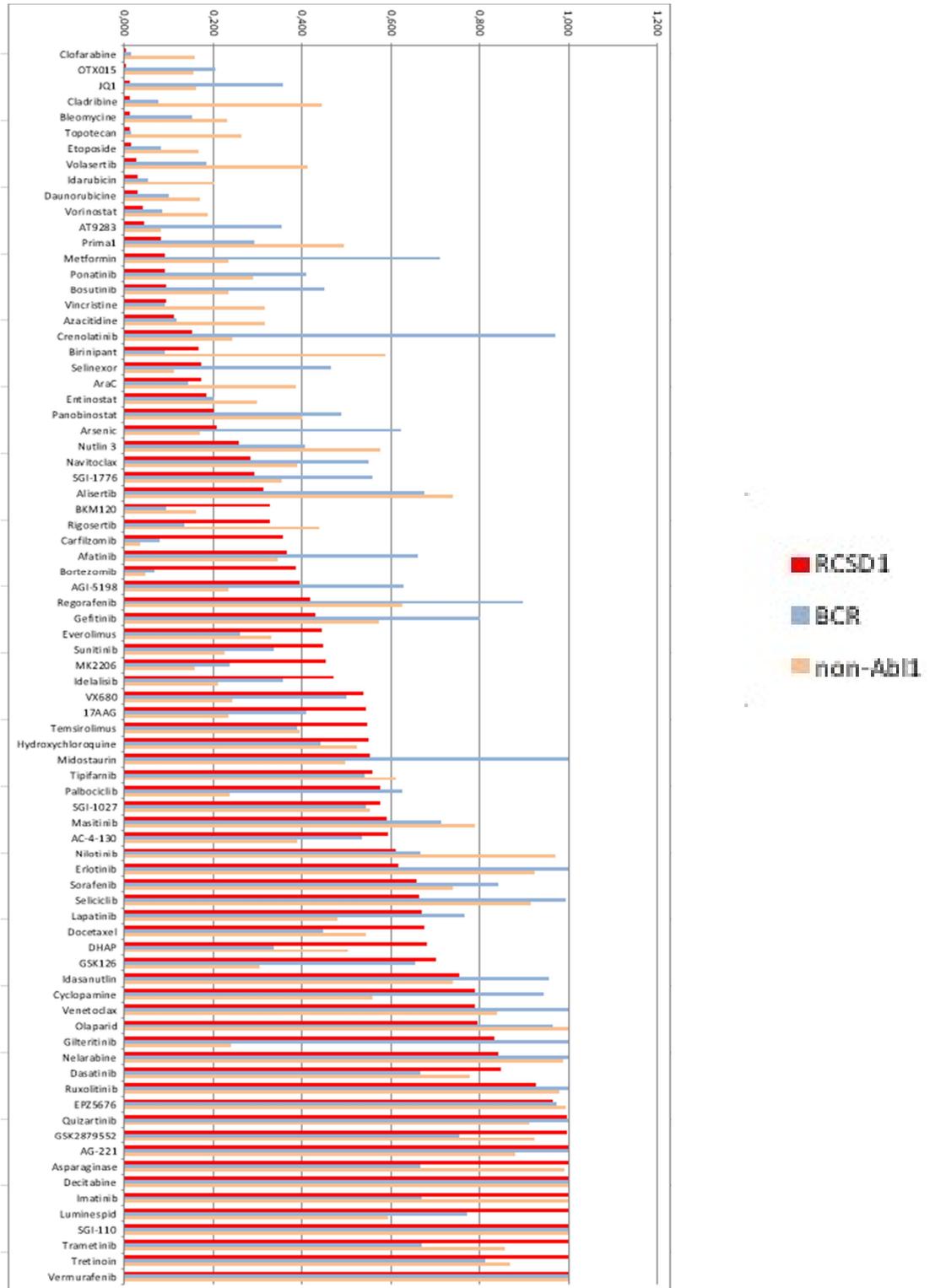


Figure 7 : classement des 79 drogues du panel, par ordre décroissant d'efficacité du groupe de patient RCSD1-Abl1 (n=3) comparé au groupe BCR-Abl1 (n=3) et au groupe non-Abl1 (qui regroupe LALB-7 et les 6 prélèvements de LAL-B de la Timone, n=7). Les valeurs sont normalisées sous la forme d'un ratio, chaque EC50 est divisée par l'EC50 le plus élevé de la cohorte des 13 prélèvements. Les drogues les plus efficaces pour RCSD1 sont en haut et les moins efficaces en bas.

Le groupe RCSD1 présente une hypersensibilité pour OTX015 et JQ1, ces 2 molécules se trouvent respectivement en 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> position du classement des drogues ayant la plus grande efficacité in vitro sur le groupe RCSD1-Abl1. Alors que le patient LALB-1 avait déjà montré des éléments de sensibilité accrue à ces épidrogues en 2017, cette hypersensibilité aux BRDi se confirme à l'échelle de notre cohorte de patients LAL-B RCSD1-Abl1.

Parmi les drogues les plus efficaces de ce groupe figure également 5 drogues cytotoxiques dont 2 antimétabolites (Clofarabine et cladribine en 1<sup>ère</sup> et 4<sup>ème</sup> position), 2 inhibiteurs de topoisomérase (topotécan et etoposide en 6<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> position) un intercalant de l'ADN (bléomycine en 5<sup>ème</sup> position). Nous remarquons que le volasertib est également efficace (7<sup>ème</sup> anticancéreux du panel), il s'agit d'un polo like kinase (PLK1) inhibiteur.

A noter que 3 des 5 inhibiteurs de tyrosine kinase BCR-Abl1, le Nilotinib, le Dasatinib et Imatinib ont une efficacité très médiocre, ils sont respectivement en 52<sup>ème</sup>, 66<sup>ème</sup> et 74<sup>ème</sup> place, alors qu'il s'agit actuellement des traitements de choix dans le traitement des LAL-B Ph-like. Le ponatinib et le bosutinib quant à eux ont une efficacité in vitro satisfaisante (respectivement en 15<sup>ème</sup> et 16<sup>ème</sup> position parmi le panel de 79 drogues), qui est aussi supérieure à celle des groupes BCR et non-Abl1.

#### Sensibilité des 13 échantillons étudiés en fonctions des groupes RCSD1, BCR et non-Abl1 pour les inhibiteurs des bromodomains JQ1 et OTX015.

Les inhibiteurs des bromodomains (BRDi) sont des petites molécules qui inhibent par compétition les protéines des bromodomains (BET), BRD2, BRD3 et BRD4. OTX015 et JQ1 sont des inhibiteurs pan-BET, ils se lient à BDR2, BDR3 et BDR4 sans sélectivité particulière. L'insertion des BRDi au niveau de la poche des bromodomains empêche la fixation des BET sur les lysines acétylées des histones et bloque leur activité. Les BET ne peuvent ainsi plus jouer leur rôle dans la régulation de la transcription de l'ADN. L'activité antiproliférative des BRDi pour les cellules tumorales a été démontrée dans de nombreux cancers. Mais les mécanismes conduisant à une sensibilité accrue ou à des résistances aux BRDi ne sont pas encore connus et il n'existe pas à ce jour de biomarqueurs prédictifs de la réponse à ces drogues<sup>18</sup>.

Ces molécules figurent en tête de liste des drogues les plus efficaces sur le groupe RCSD1. Nous avons représenté sur la figure 8 montre les EC50 de OTX015 et JQ1 sur échelle logarithmique, en comparant les 3 groupes RCSD1, BCR et non-Abl1, ainsi que les cohortes LALB-HB et LALB-HB, toutes deux issues de l'essai clinique HEMATO-BIO (IPC). Les EC50 sont très faibles pour les 3 membres du groupe RCSD1, avec une variabilité satisfaisante. Le groupe RCSD1 est statistiquement (test de Kruskal-Wallis) et significativement plus sensible que le groupe LALB-HB à OTX015 et JQ1

(respectivement  $p < 0.05$  et  $p < 0.01$ ) et ce malgré la petite taille de notre cohorte. Notons qu'une grande cohorte de patients RCSD1-Abl1 n'est pas réalisable en pratique du fait de la rareté de cette maladie, moins de 20 patients dans le monde ont présenté ce réarrangement génétique. L'hypersensibilité aux BRDi est valable pour l'ensemble du groupe RCSD1-Abl1. La suite de notre étude visera à approfondir cette relation entre le transcrite de fusion RCSD1-Abl1 et l'hypersensibilité aux BRDi.

Notre recherche se poursuit pour explorer ce profil de sensibilité aux BRDi en suivant 2 axes principaux :

- L'étude de l'expression de gènes clés, que nous avons choisis pour expliquer des sensibilités/résistances à certaines drogues (notamment des BRDi) par qRT-PCR
- L'élaboration d'un nouvel outil d'étude des profils épigénétiques, qui permettra d'expliquer cette différence de sensibilité entre les 3 groupes. Cette méthode, couplée au séquençage NGS, permettra d'étudier différentes signatures épigénétiques au niveau des gènes cibles (BRD2, BRD3, BRD4) que d'autres gènes impliqués dans la régulation des BRDi. La comparaison des profils par groupes de patients permettra de mettre en évidence des signatures épigénétiques communes pour certaines altérations génétiques (RCSD1-Abl1, BCR-Abl1, TEL-AML1...)

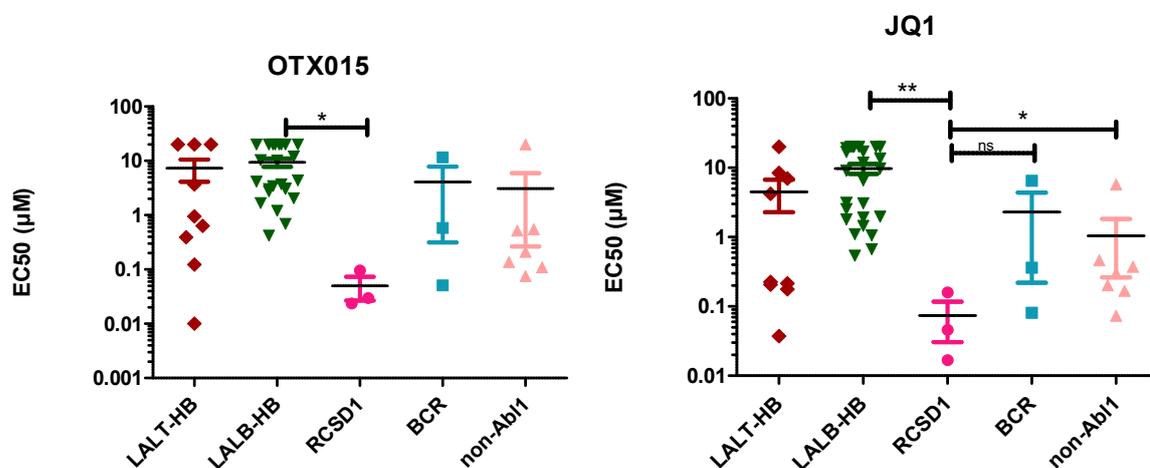


Figure 8 : Dot plot (échelle logarithmique) représentant les valeurs d'EC50 ( $\mu\text{M}$ ) de OTX015 et JQ1, pour les patients des groupes RCSD1-Abl1 ( $n=3$ ), BCR-Abl1 ( $n=3$ ), et non-Abl1 ( $n=7$ ), ainsi que les deux cohortes issues de l'essai clinique Hématobio de LALB-HB ( $n=25$ ) et de LALT-HB ( $n=9$ ). Pour OTX015, le groupe RCSD1 est significativement plus sensible à OTX015 que le groupe LALB-HB,  $p < 0.05$ . Pour JQ1, le groupe RCSD1 est significativement plus sensible à OTX015 que le groupe LALB-HB,  $p < 0.01$  et que le groupe non-Abl1,  $p < 0.05$

## **b) Résultats de l'étude de l'expression des gènes par qRT-PCR :**

Les 13 échantillons ont été soumis à une étude d'expression génique par la technologie qRT-PCR. L'ARN contenu dans les cellules est le reflet de l'expression des gènes. La quantification d'ARN après l'extraction a exclu LALB-7 et de l'étude car le prélèvement était de mauvaise qualité (quantité trop faible d'ARN). Pour rappel, l'ARN se dégrade très facilement (RNases sont omniprésentes dans l'environnement).

Les gènes que nous avons choisi d'étudier sont associés à la cible (effet « on target »), impliqués dans une voie de signalisation pertinente, ou déjà décrit dans la littérature comme associés à une résistance ou sensibilité particulière.

### Focus sur les épидrogues : évaluation de l'expression des gènes BET, HDAC et MYC dans nos différents échantillons

En vue de documenter l'hypersensibilité des BRDi vis-à-vis des LAL-B RCSD1-Abl1, l'analyse des niveaux d'expression des gènes codant pour les protéines BET (BRD2, BRD3 et BRD4) et l'expression du gène Myc ont été explorés. Les expressions relatives de ces gènes sont illustrées sur la figure 9.

BRD2 a l'expression la plus forte parmi les BET sur l'ensemble de la cohorte. LALB-10 exprime le plus BRD2, et l'expression du gène augmente au moment de la rechute pour les 3 pédiatriques (LALB-8, LALB-9 et LALB-10). BRD3 est moins exprimé que BRD2 avec un niveau d'expression qui reste élevé pour le couple D/R de LALB-10. BRD4 a une expression très faible, mais stable sur tous les échantillons, à un niveau équivalent sur les échantillons hypersensibles par rapport aux autres échantillons.

L'expression de MYC est très variée d'un échantillon à l'autre. De façon très marquante, LALB-1 a un très fort niveau d'expression de MYC (4,1 fois supérieure à la moyenne de la cohorte), or il s'agit d'un des 3 échantillons étudiés pour l'hypersensibilité aux BRDi. Par ailleurs, l'expression de MYC est augmentée au moment de la rechute pour LALB-10 (d'un rapport 4) et pour LALB-8 (d'un rapport 2,2), ce qui est intéressant car les cellules deviennent plus sensibles lors de la rechute (JQ1 ratio R/D = 0.36 pour LALB-8 et 0.56 LALB-10).

Myc est un oncogène dont la surexpression est observée dans de nombreux cancers <sup>47</sup>. Les réarrangements impliquant Myc aboutissent le plus souvent à la surexpression de Myc, qui contribue

à la leucémogénèse et implique un plus sombre pronostic. Il n'existe à ce jour pas d'anticancéreux qui ciblent directement Myc.<sup>35</sup> Les BRDi permettent de manière indirecte par modulation de l'épigénétique d'abroger de manière rapide et puissante la transcription du gène Myc.<sup>48</sup> OTX015 et JQ1 ont déjà donné la preuve d'une diminution très significative de MYC dans la leucémie aigüe (LAM et LAL) et aboutissent à la diminution de la transcription des gènes dépendant de Myc (E2F1, le promoteur proximal de la RNA polymérase II...)<sup>49 50</sup> ainsi que la réactivation de gènes suppresseurs de tumeur tels que p21. Comme nous l'avons évoqué dans la première partie de ce manuscrit, le statut mutationnel de Myc et une expression élevée de Myc dans les cellules cancéreuse est connue comme associée à une sensibilité accrue aux BRDi<sup>51</sup>.

Nous avons également cherché à étudier des relations entre les HDACi et l'expression des gènes HDAC7 et HDAC9. HDAC9 est très peu exprimée sur l'ensemble des patients, sauf LALB-8R qui exprime 5,7 fois plus ce gène que la moyenne de la cohorte. L'expression de HDAC7 varie peu d'un échantillon à l'autre. Ces intensités d'expressions pour les gènes HDAC7 et HDAC9 ne semblent pas corrélées avec les profils de sensibilité à Entinostat, Panobinostat ni Vorinostat

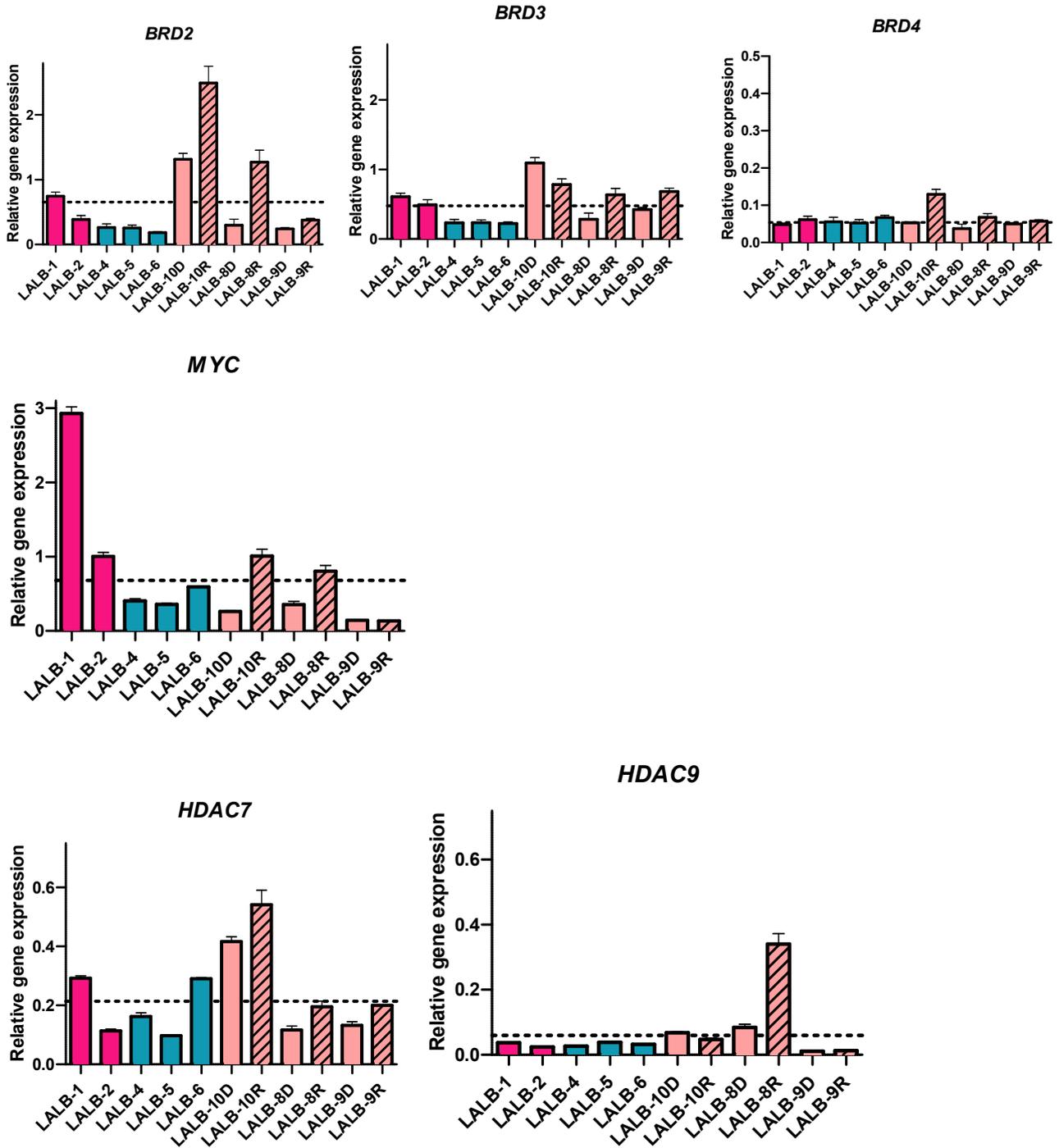


Figure 9 : histogramme révélant les intensités d'expressions relatives des gènes BRD2, BRD3, BRD4, MYC, HDAC7 et HDAC9 obtenues par qRT-PCR

Autres cibles/ voies d'action des anticancéreux : expression des gènes TNFRSF1a, BCL2, PLK1, PAK1, CDK4 et XPO1 (figure 10)

Nous avons étudié l'expression du gène TNFRSF1a, qui code pour le récepteur TNFR1. L'étude de Richmond et al (cancerRes, 2016) qui réunit 9 LAL-B Ph-like sur 41 PDX de LAL-B, a montré in vivo (sur PDX) et in vitro sur la LAL-B qu'une hypersensibilité au birinapant est associée à une augmentation d'expression du récepteur TNFR1<sup>52</sup>. Le birinapant est une petite molécule mimétique du régulateur apoptotique SMAC. Son action mimétique de SMAC inhibe XIAP et cIAP et restaure l'apoptose. Nous ne retrouvons pas cette corrélation sur nos échantillons. En effet, les 3 échantillons associés à une hypersensibilité sont LALB-2 (RCSD1-Abl1), LALB-5 et LALB-6 (2 patients Ph+), alors que l'expression du gène TNFRSF1a est à la moyenne basse de la cohorte. Par ailleurs, les 4 échantillons les plus résistants au birinapant, sont LALB-9 et LALB-10 (diagnostic et rechute), or ils expriment fortement le gène TNFRSF1a. A noter que ces 4 échantillons résistants ont en commun la mutation TEL-AML1.

Nous avons intégré le gène BCL2 à cette expérience car il est impliqué dans de nombreuses voies de signalisations sur lesquelles agissent les anticancéreux de notre panel. En mettant ces résultats en regards avec les sensibilités aux 2 anti-BCL2 (Navitoclax et Venetoclax), nous n'avons pas montré de corrélation entre niveau d'expression du gène BCL-2 et sensibilité à cette classe thérapeutique. En revanche, BCL-2 est activé par les récepteurs EGFR/HER2 via la cascade PIK3/AKT/mTOR. LALB-10 présente une hypersensibilité pour l'afatinib (EGFR/HER2 inhibiteur) associée à une expression très augmentée de BCL2. Cette corrélation n'est pas valable pour les autres EGRF/HER2 inhibiteurs (erlotinib, lapatinib). Cette piste nécessite des explorations supplémentaires.

XPO1(exportine-1) est le gène codant pour CRM1 (Chromosomal Maintenance 1). La surexpression de XPO1 confère une résistance des cellules leucémiques à l'apoptose, et est souvent associée à un mauvais pronostic<sup>53</sup> Une publication de 2013 dans Blood met en lumière la surexpression de XPO1 dans les leucémies Ph+ et Ph-<sup>54</sup>. Nous n'observons pas de corrélation entre sensibilité au Selinexor (CRM1 inhibiteur) et niveau d'expression du gène XPO1. Il y a une élévation de l'expression de XPO1 pour l'ensemble des patients RCSD1-Abl1 et BCR-Abl1.

PLK1 est la principale cible du volasertib. Il n'y a pas de corrélation évidente entre l'expression de la PLK1 et la sensibilité au volasertib.

Le gène PAK1 qui code pour la kinase PAK1 (sérine/thréonine protéine kinase 1) est surexprimé dans de nombreux cancer. Son expression est stable sur les 13 échantillons étudiés.

CDK4 est le gène codant pour la Cyclin-dépendante kinase 4 (CDK4), surexprimé dans de nombreux cancers et impliquant un sombre pronostic<sup>55</sup>. Parmi les 3 échantillons les plus résistants au palbociclib (CDK4/6 inhibiteur) figurent LALB-1, LALB-8R et LALB-6. Les expressions géniques sont augmentées pour LALB-1 et LALB-8R mais pas pour LALB-6. Nous n'avons pas assez d'éléments pour établir une tendance.

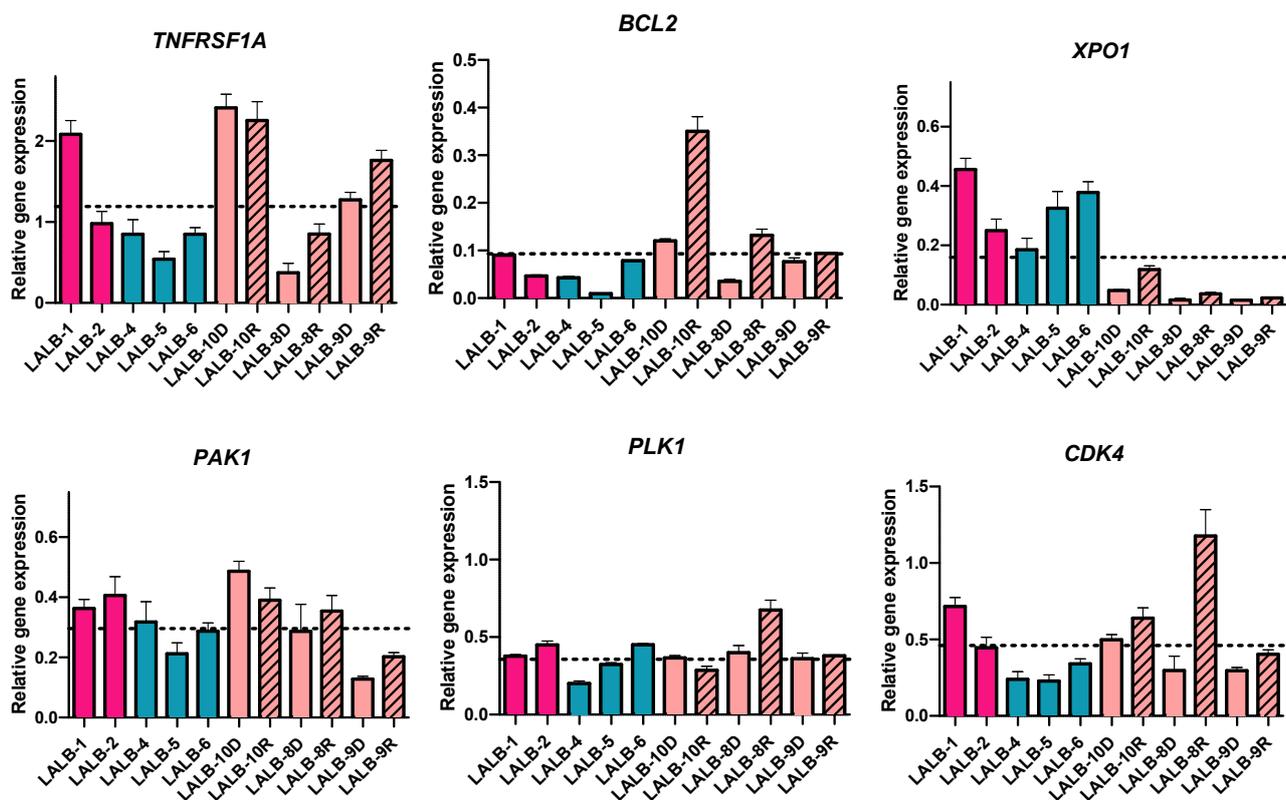


Figure 10 : histogramme révélant les intensités d'expressions relatives des gènes TNFRSF1a, BCL2, XPO1, PAK1, PLK1, CDK4 obtenues par qRT-PCR

### **c) Résultats préliminaires du CUT and RUN :**

#### **Mise en place d'un nouvel outil d'étude des marques épigénétiques des cellules tumorales :**

Les échantillons sur lesquels porte mon projet de recherche sont des échantillons biologiques issus de patients atteints de LAL-B. La méthodologie du CUT and RUN est maîtrisée au CRCM par Eddy Pasquier, sur lignées cellulaires (MOLM14...). Or les échantillons issus de patients ont une viabilité nettement inférieure. D'autre part, les comportements de cellules leucémiques issues de patients sont bien plus imprévisibles que les comportements des lignées cellulaires sur lesquels un génome fixe et connu, ainsi que des caractéristiques de signalisation cellulaire particulières sont établis. Le contrôle qualité que nous avons réalisé à la fin de tous les CUT and RUN était donc l'étape déterminante pour poursuivre notre travail d'étude de l'épigénétique. Ce contrôle qualité détermine la qualité du prélèvement par qPCR. Les anticorps spécifiques anti-BRD4, et de H3K27Ac et H3K27me3 permettent d'étudier les régions de l'ADN riches en BRD4, ainsi que les marques d'activation H3K27Ac et de répression H3K27me3.

La quantification de l'ADN est déterminée à partir du Ct, convertis en abondance d'ADN relative, qui reflète la quantité d'ADN (cf figure 11). Les primers utilisés sont GAPDH et HOXD11.

GAPDH est un gène de ménage qui est toujours fortement exprimé. Il ne présente donc pas de triméthylation mais une acétylation des histones et probablement liaison de BRD4. (H3K27ac+, H3K27 -).

HOXD11 est un gène uniquement exprimé pendant le développement embryonnaire, réprimé dans les cellules matures. Il est donc hyperméthylé (H3K27me3+) mais pas acétylé (H3K27ac-) donc pas de liaison de BRD4. Le contrôle IgG est le reflet du bruit de fond global.

Les 13 échantillons ont tous passé favorablement le contrôle qualité, permettant une analyse par séquençage NGS.

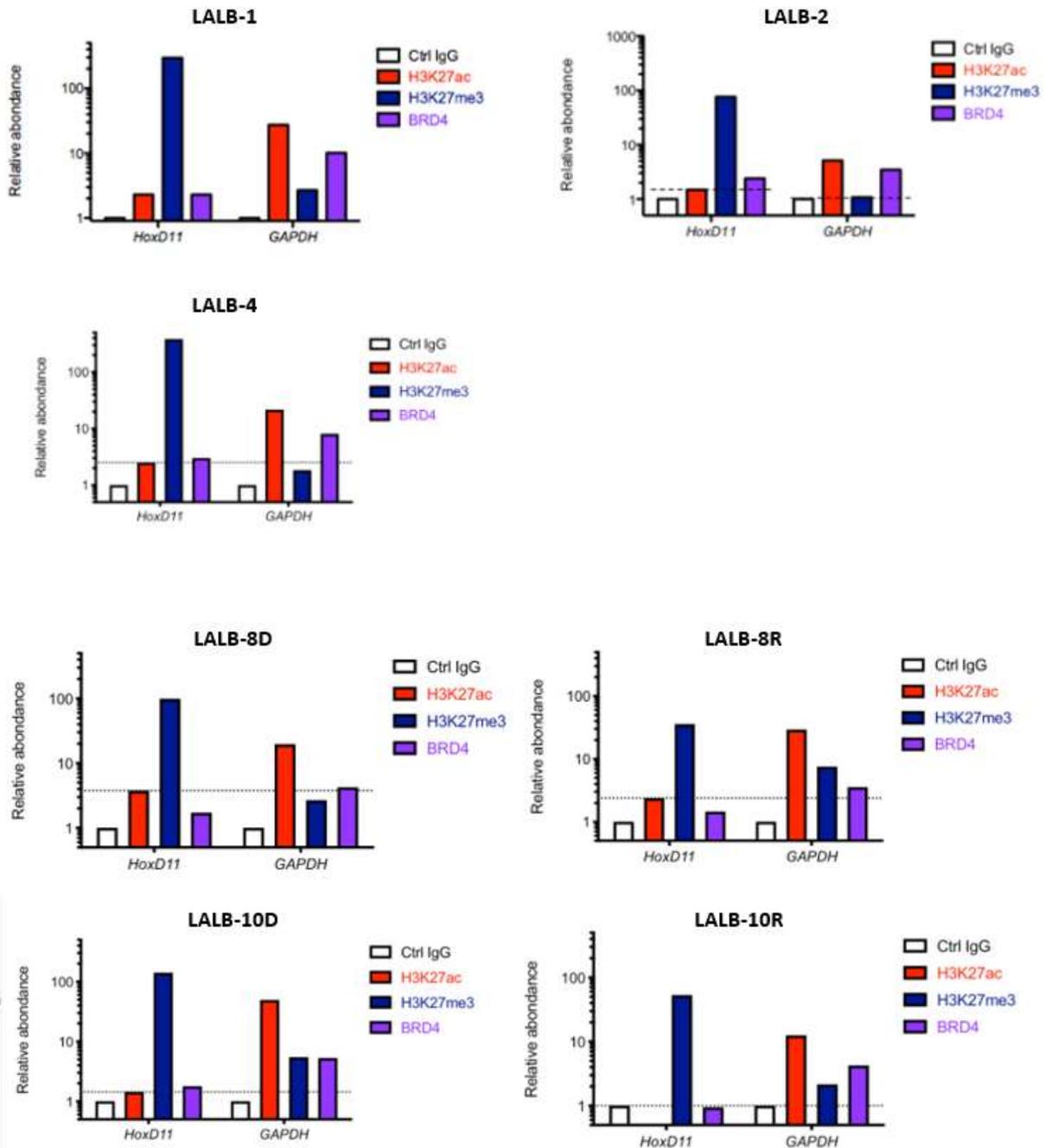


Figure 11 : Contrôle qualité des échantillons issus du CUT and RUN. Les histogrammes représentent les abondances relatives d'ADN porteur de la marque activatrice H3K27ac, de la marque répressive H3K27me3, du facteur de transcription BRD4 et du contrôle IgG pour les gènes *HoxD11* et *GAPDH*.

## Résultats préliminaires et objectifs du profilage épigénétique par CUT and RUN :

Le séquençage et l'analyse bio-informatique permettront d'établir un profil épigénétique pour chacun des 13 échantillons, à partir des marques épigénétiques étudiées (marque activatrice H3K27ac, marque répressive H3K27me3 et BRD4).

Nous avons obtenu des résultats préliminaires à partir des données du séquençage sur le gène Myc. Ces résultats portent sur les 8 premiers échantillons séquencés. Il s'agit de 2 échantillons RCSD1-Abl1 (LALB-1 et LALB-2), de 3 échantillons BCR-Abl1 (LALB-4, LALB-5 et LALB-6) et de 3 échantillons non-Abl1 (LALB-7, LALB-10D et LALB-10R). Malheureusement, les résultats du séquençage de LALB-1 sur la marque H3K27Ac ne peut pas être exploité.

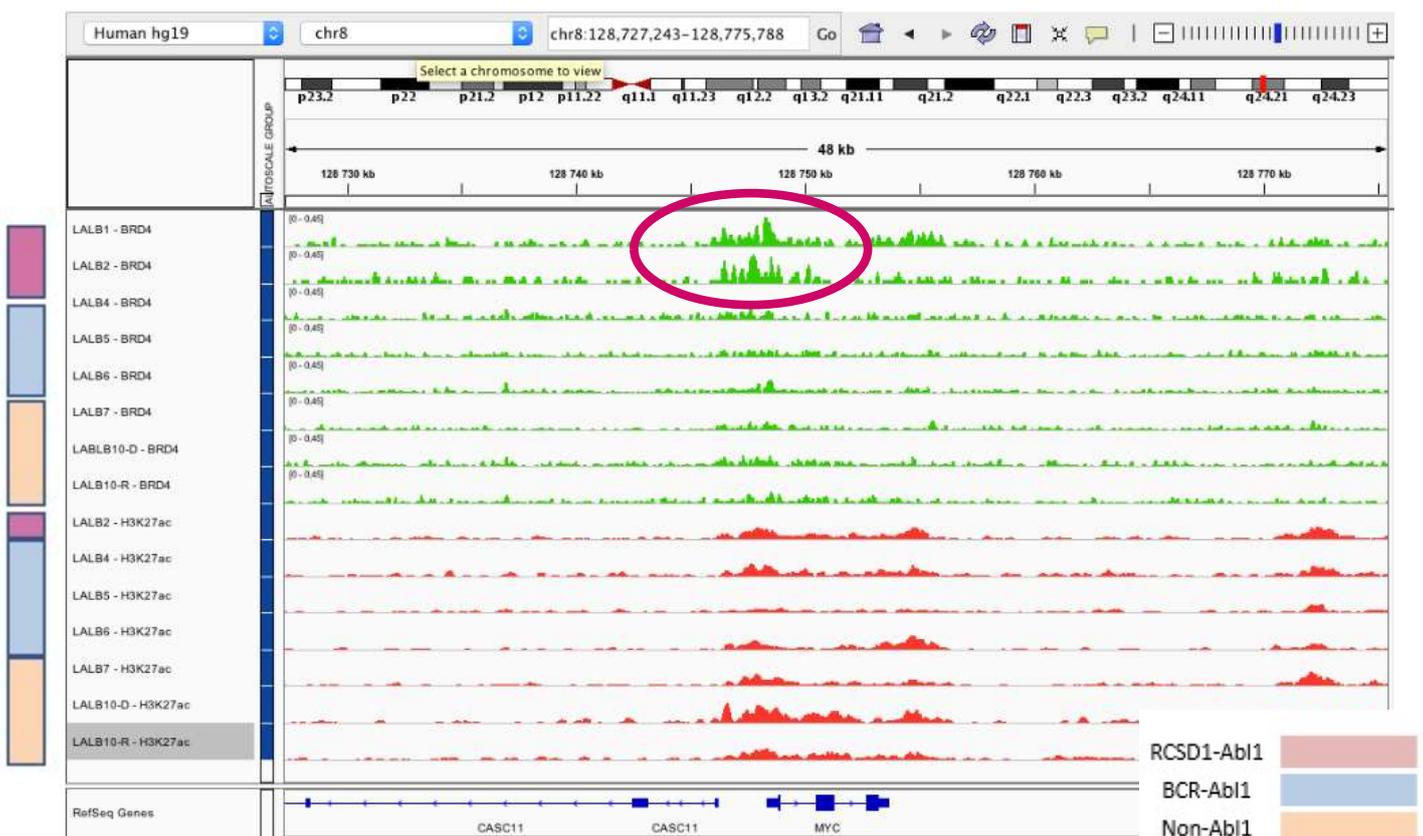


Figure 12 : distribution de la marque épigénétique H3K27ac (en rouge) et de la liaison de la protéine BRD4 (en vert) sur la région du gène MYC. En rouge, les régions d'ADN avec beaucoup de H3K27ac, en vert les régions avec beaucoup de BRD4.

Ces résultats (figure 12) confirment d'une part que ce nouvel outil est efficace pour étudier des marques épigénétiques sur échantillons de patients. Pour rappel, l'analyse épigénétique des cellules de patients de heurte actuellement à 2 difficultés principales : la rareté du matériel biologique et la fragilité des cellules, rendant la culture difficile. Le CUT and RUN permet de s'affranchir de ces difficultés car 1 million de cellules fraîches sont suffisantes.

Les intensités des marques épigénétiques H3K27ac et BRD4 sur le gène Myc sont corrélées aux tailles des pics verts (BRD4) et rouge (H3K27Ac). On voit sur tous les patients au niveau du site d'initiation de la transcription du gène de Myc, une acétylation de H3K27, et une augmentation en parallèle de BRD4.

Les résultats obtenus sur la figure 12 montrent que les 2 patients RCSD1-Abl1 (LALB-1 et LALB-2) présentent une fixation de BRD4 plus importante au niveau du site d'initiation de la transcription de Myc. L'acétylation de H3K27 est également plus importante pour LALB-2, et non interprétable pour LALB-1. Ce résultat est en faveur d'une augmentation de l'expression de l'oncogène Myc.

Pour rappel, ces deux patients présentent une hypersensibilité aux BRDi, ciblant BRD4. Une hypothèse permettant d'expliquer l'hypersensibilité de JQ1 et OTX015 sur LALB-1 et LALB-2 serait une augmentation de la fixation de ces petites molécules au niveau du site d'initiation de la transcription du gène Myc, permettant une diminution de l'expression du gène Myc dans les cellules cancéreuses surexprimant Myc.

#### **4) DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

##### **a) Interprétation et perspectives de l'analyse épigénétique**

L'analyse bio-informatique des données de séquençage de nos échantillons obtenus en CUT&RUN qui a donné les résultats préliminaires ci-dessus est encore en cours, elles sont réalisées au sein du CRCM par Julien Vernerey. Nous aurons pour les 13 échantillons et sur l'ensemble de leur génome, les régions de l'ADN concernées par des modifications post traductionnelles de l'histone H3 : la marque activatrice H3K27Ac et la marque répressive H3K27me3 ; ainsi que la liaison de BRD4 à l'ADN. Les données du séquençage sont une somme colossale d'informations, la suite de l'analyse consiste à continuer de cibler des régions d'intérêt : exons, promoteurs et régions régulatrices des gènes Myc, des BET, et autres gènes associés dans les voies de régulation des BRDi... Il serait également

intéressant d'étudier les statuts épigénétiques du gène codant pour STAT5. Ces données pourraient permettre d'établir un lien entre l'hypersensibilité des BRDi pour les LAL-B RCSD1-Abl1 que nous avons observée avec l'augmentation de l'expression de STAT5 dans la LAL-B RCSD1-Abl1 (E. Drivet, 2017).

#### **b) Perspectives au niveau post-traductionnel : Analyses phosphoprotéomiques**

Ces résultats seront confrontés à l'étude des niveaux de phosphorylation des protéines. La signalisation intracellulaire sera étudiée par l'étude des niveaux de phosphorylation sur les résidus sérine et thréonine dans les cellules. Une analyse comparative sera établie sur les niveaux de phosphorylation global entre les 3 groupes de notre étude (RCSD1, BCR, non-Abl1). Le projet est actuellement en cours avec l'équipe phosphoprotéomique (Luc Camoin et Stéphane Audebert) du CRCM. Ces résultats permettront d'expliquer certains mécanismes impliqués dans la sensibilité aux épiproges et sur les mécanismes oncogénique de RCSD1-Abl1.

#### **c) Perspectives au niveau protéomique et transcriptomique**

OTX015 et JQ1 sont des inhibiteurs pan-BET, ils ont une affinité pour BRD2, BRD3 et BRD4. Cependant, leur affinité n'est pas la même pour chaque cible. Une étude protéomique permettra d'évaluer les niveaux d'expression de BRD2, BRD3, BRD4 et Myc par Western blot sur nos échantillons.

L'analyse que nous avons réalisée par qRT-PCR permet l'analyse d'une dizaine de gènes que nous avons sélectionné sur une logique ciblée (littérature, effet on-target...) Une analyse transcriptomique par séquençage de l'ARN à haut débit (RNA-seq) est en cours au sein du CRCM (équipe de D. Birnbaum et F. Bertucci). Ces datas permettront de connaître les intensités d'expressions de tous les gènes.

#### **d) Perspectives sur les PDX :**

Une des limites des PDX est que des mutations se sont probablement ajoutées ou déléetées au clone d'origine lors du passage dans le modèle murin. D'autre part, la leucémie aigüe d'origine est souvent elle-même constituée de plusieurs sous clones dont on ne connaît pas l'identité précise. Pour pallier cette limite, l'équipe TrGET a effectué une revue de la littérature qui indique une bonne conservation

des caractères cytogénétiques propres aux cellules primaires. Un contrôle de la qualité des PDX est également réalisé dans le laboratoire d'oncogénomique de l'IPC par CGH-array, qui permet de détecter les déséquilibres génomiques de tailles des chromosomes (perte ou gain de matériel).

L'étude génomique des cellules leucémiques des PDX par séquençage NGS est la prochaine étape, et est déjà en cours de traitement pour les échantillons de LAM.

### **e) Résultats additionnels : profils de sensibilité/résistance au birinapant et au gilteritinib, nouvelles perspectives d'études**

#### Profil de réponse au Birinapant et gène de fusion TEL-AML1 (figure 13)

Les LAL-B issues des patients de la Timone LALB-9 et LALB-10, et qui ont en commun l'anomalie cytogénétique commune TEL-AML1, présentent une résistance particulière pour le birinapant ( $EC_{50} > 2\mu M$ ) au moment du diagnostic et de la rechute. C'est une tendance à la résistance qui se dégage de ces courbes du fait de notre petite cohorte. Cette observation n'a pas été retrouvée dans la littérature.

#### Gilteritinib et statut mutationnel de FLT3 dans la LAL-B (figure 14)

Les 3 patients pédiatriques de la Timone (LALB-8, LALB-9 et LALB-10) semblent plus sensibles au Gilteritinib, petite molécule inhibitrice de la FMS-like Tyrosine kinase-3 (FLT3). Cette molécule est souvent utilisée pour traiter des cancers FLT3 mutés. La mutation FLT3 est responsable d'une activation de l'expression de la tyrosine kinase FLT3 et diminue le pronostic de la maladie. Des études génétiques seraient à réaliser sur ces échantillons notamment pour connaître leur statut mutationnel de FLT3. Une étude publiée dans Blood en 2004 indique que la mutation FLT3 est souvent rencontrée dans les LAL-B hyperploïdes (25%, 6/25 LAL-B hyperploïdes) et peu retrouvée dans les LAL-B TEL-AML1 (1/29). Or parmi la cohorte de la Timone figure 2/3 LAL-B avec transcrite de fusion TEL-AML1.

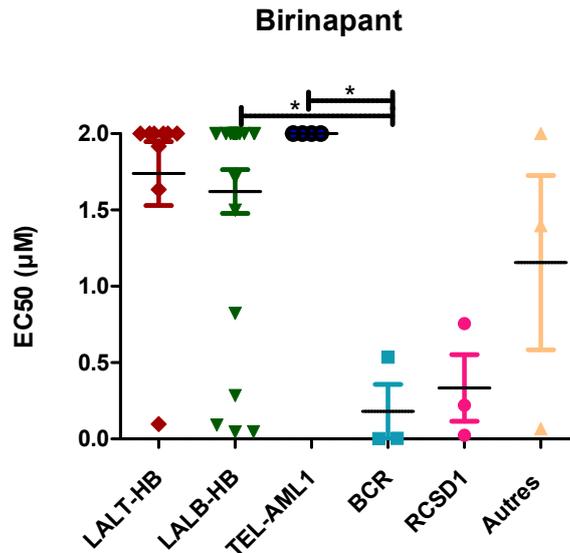


Figure 13 : Dot plot représentant les valeurs d'EC50 ( $\mu\text{M}$ ) du birinapant, pour les patients des groupes RCSD1-Abl1 (n=3), BCR-Abl1 (n=3), TEL-AML1 (n=4) et Autres (n=3), ainsi que deux cohortes Hématobio de LALB-HB (n=25) et de LALT-HB (n=9). Le groupe TEL-AML1 est significativement plus résistant au birinapant que le groupe BCR-Abl1,  $p < 0.05$  (et le groupe LALB-HB est plus résistant que BCR-Abl1,  $p < 0.05$ ) (test de Kruskal-Wallis).

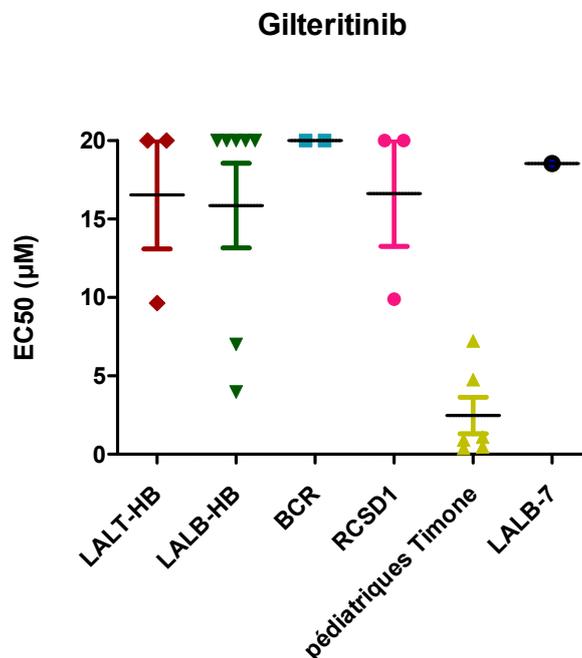


Figure 14 : Dot plot représentant les valeurs d'EC50 ( $\mu\text{M}$ ) du Gilteritinib, pour les patients des groupes RCSD1-Abl1 (n=3), BCR-Abl1 (n=3), et Pédiatriques Timone (n=6), et LALB-7, ainsi que deux cohortes Hématobio de LALB-HB (n=9) et de LALT-HB (n=3). Le groupe Pédiatriques Timone est significativement plus sensible au Gilteritinib que le groupe LALB,  $p < 0.1$  (test de Kruskal-Wallis).

## 5) CONCLUSION

Nous présentons les résultats de notre étude translationnelle sur un petit panel de LAL-B constitué de patients porteurs des transcrits de fusion RCSD1-Abl1 et BCR-Abl1 et de patients ne portant pas de transcrit de fusion impliquant Abl. Des profils de sensibilité/résistance à un panel de 79 anti-cancéreux ont été réalisés pour chaque patient. Nous avons mis en évidence une hypersensibilité aux BRDi au sein du groupe de patients LAL-B porteurs de transcrit de fusion RCSD1-Abl1. Cette LAL-B Ph-like est de sombre pronostic et nécessite de nouvelles approches thérapeutiques.

Les BRDi et plus largement les épidrogues sont une piste thérapeutique encourageante et sont en plein essor en cancérologie. Ils agissent en modulant l'épigénétique, en restaurant les dérégulations épigénétiques responsables de la tumorigénèse ou en créant des altérations épigénétiques délétères pour les cellules cancéreuses. Des études épigénétiques sont à réaliser pour comprendre ces phénomènes d'hypersensibilité et prescrire ces épidrogues aux pathologies adaptées.

Notre étude a permis de mettre au point un nouvel outil d'étude du profil épigénétique des cellules leucémiques à partir de cellules de patients (PDX) : le CUT and RUN. Cette méthode, couplée au NGS, permet d'étudier des signatures épigénétiques sur tout le génome. Notre profil épigénétique est réalisé à partir de la marque d'activation des histones H3K27Ac, de la marque répressive H3K27me3 et de la protéine BRD4. Cet outil permet d'étudier des dizaines de marques d'acétylation et de méthylations différentes, ainsi que des facteurs de transcriptions ou autres protéines se liant à l'ADN. A terme, le CUT and RUN permettra d'identifier des signatures épigénétiques de réponse aux drogues dans les LAL-B et participera à élucider toutes les questions que posent encore les épidrogues (mécanisme d'action, biomarqueur...)

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> F X Gros et al., « une nouvelle entité biologique », *Mis e au point*, 2017, 7.
- <sup>2</sup> Shugui Chen et al., « Abl N-Terminal Cap Stabilization of SH3 Domain Dynamics », *Biochemistry* 47, n° 21 (27 mai 2008): 5795-5803, <https://doi.org/10.1021/bi800446b>.
- <sup>3</sup> Alfonso Quintás-Cardama et Jorge Cortes, « Molecular Biology of Bcr-Abl1-Positive Chronic Myeloid Leukemia », *Blood* 113, n° 8 (19 février 2009): 1619-30, <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-144790>.
- <sup>4</sup> Jean Y. J. Wang, « Controlling Abl: Auto-Inhibition and Co-Inhibition? », *Nature Cell Biology* 6, n° 1 (janvier 2004): 3-7, <https://doi.org/10.1038/ncb0104-3>.
- <sup>5</sup> R. Agami et al., « Interaction of C-Abl and P73alpha and Their Collaboration to Induce Apoptosis », *Nature* 399, n° 6738 (24 juin 1999): 809-13, <https://doi.org/10.1038/21697>.
- <sup>6</sup> Agata Klejman et al., « The Src Family Kinase Hck Couples BCR/ABL to STAT5 Activation in Myeloid Leukemia Cells », *The EMBO Journal* 21, n° 21 (1 novembre 2002): 5766-74, <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf562>.
- <sup>7</sup> N. Carlesso, D. A. Frank, et J. D. Griffin, « Tyrosyl Phosphorylation and DNA Binding Activity of Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) Proteins in Hematopoietic Cell Lines Transformed by Bcr/Abl », *The Journal of Experimental Medicine* 183, n° 3 (1 mars 1996): 811-20, <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.811>.
- <sup>8</sup> « Horizons-Hemato-Décembre-2015-213-215-Rousselot.pdf », s. d.
- <sup>9</sup> Etienne De Braekeleer et al., « ABL1 Fusion Genes in Hematological Malignancies: A Review », *European Journal of Haematology* 86, n° 5 (mai 2011): 361-71, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2011.01586.x>.
- <sup>10</sup> C. Graux et al., « Fusion of NUP214 to ABL1 on Amplified Episomes in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia », *Nature Genetics* 36, n° 10 (octobre 2004): 1084-89, <https://doi.org/10.1038/ng1425>.
- <sup>11</sup> K. De Keersmaecker et al., « Intrinsic Differences between the Catalytic Properties of the Oncogenic NUP214-ABL1 and BCR-ABL1 Fusion Protein Kinases », *Leukemia* 22, n° 12 (décembre 2008): 2208-16, <https://doi.org/10.1038/leu.2008.242>.
- <sup>12</sup> Marketa Zaliouva et al., « Characterization of leukemias with ETV6-ABL1 fusion », *Haematologica* 101, n° 9 (septembre 2016): 1082-93, <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.144345>.
- <sup>13</sup> J. Voss et al., « The Leukaemic Oncoproteins Bcr-Abl and Tel-Abl (ETV6/Abl) Have Altered Substrate Preferences and Activate Similar Intracellular Signalling Pathways », *Oncogene* 19, n° 13 (23 mars 2000): 1684-90, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203467>.
- <sup>14</sup> E. De Braekeleer et al., « A New Partner Gene Fused to ABL1 in a t(1;9)(Q24;Q34)-Associated B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia », *Leukemia* 21, n° 10 (octobre 2007): 2220-21, <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404773>.
- <sup>15</sup> Thomas Perwein et al., « Imatinib-Induced Long-Term Remission in a Relapsed RCSD1-ABL1-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia », *Haematologica* 101, n° 8 (2016): e332-335, <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.139568>.
- <sup>16</sup> De Braekeleer et al., « ABL1 Fusion Genes in Hematological Malignancies ».
- <sup>17</sup> Y Collette et al., « Drug Response Profiling Can Predict Response to Ponatinib in a Patient with t(1;9)(Q24;Q34)-Associated B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia », *Blood Cancer Journal* 5, n° 3 (mars 2015): e292-e292, <https://doi.org/10.1038/bcj.2015.13>.
- <sup>18</sup> Philipp Rathert et al., « Transcriptional Plasticity Promotes Primary and Acquired Resistance to BET Inhibition », *Nature* 525, n° 7570 (24 septembre 2015): 543-47, <https://doi.org/10.1038/nature14898>.
- <sup>19</sup> Miriam Frech et al., « Dasatinib and allogeneic stem cell transplantation enable sustained response in an elderly patient with RCSD1-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia », *Haematologica* 102, n° 4 (avril 2017): e160-62, <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.160531>.
- <sup>20</sup> Thomas Perwein et al., « Imatinib-Induced Long-Term Remission in a Relapsed RCSD1-ABL1-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia », *Haematologica* 101, n° 8 (2016): e332-335, <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.139568>.
- <sup>21</sup> Brent W. Weston et al., « Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy Induces Remission in a Patient with Refractory EBF1-PDGFRB-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia », *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 31, n° 25 (1 septembre 2013): e413-416, <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.47.6770>.
- <sup>22</sup> « Reading the second genomic code | Nature », consulté le 26 octobre 2020, <https://www.nature.com/articles/491143a>.
- <sup>23</sup> Yujiang Shi et al., « Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1 », *Cell* 119, n° 7 (29 décembre 2004): 941-53, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.012>.
- <sup>24</sup> Celia J. Webby et al., « Jmjd6 Catalyses Lysyl-Hydroxylation of U2AF65, a Protein Associated with RNA Splicing », *Science (New York, N.Y.)* 325, n° 5936 (3 juillet 2009): 90-93, <https://doi.org/10.1126/science.1175865>.
- <sup>25</sup> Jakob Lovén et al., « Selective Inhibition of Tumor Oncogenes by Disruption of Super-Enhancers », *Cell* 153, n° 2 (11 avril 2013): 320-34, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.036>.

- <sup>26</sup> Azadeh Hajmirza et al., « BET Family Protein BRD4: An Emerging Actor in NFκB Signaling in Inflammation and Cancer », *Biomedicines* 6, n° 1 (6 février 2018), <https://doi.org/10.3390/biomedicines6010016>.
- <sup>27</sup> Ballachanda N. Devaiah et al., « BRD4 Is an Atypical Kinase That Phosphorylates Serine2 of the RNA Polymerase II Carboxy-Terminal Domain », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, n° 18 (1 mai 2012): 6927-32, <https://doi.org/10.1073/pnas.1120422109>.
- <sup>28</sup> Aaron J. Stonestrom et al., « Functions of BET proteins in erythroid gene expression », *Blood* 125, n° 18 (30 avril 2015): 2825-34, <https://doi.org/10.1182/blood-2014-10-607309>.
- <sup>29</sup> Gary LeRoy, Brenden Rickards, et S. J. Flint, « The Double Bromodomain Proteins Brd2 and Brd3 Couple Histone Acetylation to Transcription », *Molecular Cell* 30, n° 1 (11 avril 2008): 51-60, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.01.018>.
- <sup>30</sup> Azadeh Hajmirza et al., « BET Family Protein BRD4: An Emerging Actor in NFκB Signaling in Inflammation and Cancer », *Biomedicines* 6, n° 1 (6 février 2018), <https://doi.org/10.3390/biomedicines6010016>.
- <sup>31</sup> Emily J. Faivre et al., « Selective Inhibition of the BD2 Bromodomain of BET Proteins in Prostate Cancer », *Nature* 578, n° 7794 (2020): 306-10, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1930-8>.
- <sup>32</sup> Guillaume Andrieu, Anna C. Belkina, et Gerald V. Denis, « Clinical Trials for BET Inhibitors Run Ahead of the Science », *Drug Discovery Today. Technologies* 19 (mars 2016): 45-50, <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2016.06.004>.
- <sup>33</sup> Suhu Liu et al., « Targeting STAT5 in Hematologic Malignancies through Inhibition of the Bromodomain and Extra-Terminal (BET) Bromodomain Protein BRD2 », *Molecular Cancer Therapeutics* 13, n° 5 (mai 2014): 1194-1205, <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0341>.
- <sup>34</sup> Jennifer A. Mertz et al., « Targeting MYC Dependence in Cancer by Inhibiting BET Bromodomains », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, n° 40 (4 octobre 2011): 16669-74, <https://doi.org/10.1073/pnas.1108190108>.
- <sup>35</sup> Jake E. Delmore et al., « BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc », *Cell* 146, n° 6 (16 septembre 2011): 904-17, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.017>.
- <sup>36</sup> Philipp Rathert et al., « Transcriptional Plasticity Promotes Primary and Acquired Resistance to BET Inhibition », *Nature* 525, n° 7570 (24 septembre 2015): 543-47, <https://doi.org/10.1038/nature14898>.
- <sup>37</sup> Mertz et al., « Targeting MYC Dependence in Cancer by Inhibiting BET Bromodomains ».
- <sup>38</sup> Jennifer A. Mertz et al., « Targeting MYC Dependence in Cancer by Inhibiting BET Bromodomains », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, n° 40 (4 octobre 2011): 16669-74, <https://doi.org/10.1073/pnas.1108190108>.
- <sup>39</sup> Benjamin Bian et al., « Gene Expression Profiling of Patient-Derived Pancreatic Cancer Xenografts Predicts Sensitivity to the BET Bromodomain Inhibitor JQ1: Implications for Individualized Medicine Efforts », *EMBO Molecular Medicine* 9, n° 4 (2017): 482-97, <https://doi.org/10.15252/emmm.201606975>.
- <sup>40</sup> Agata Klejman et al., « The Src Family Kinase Hck Couples BCR/ABL to STAT5 Activation in Myeloid Leukemia Cells », *The EMBO Journal* 21, n° 21 (1 novembre 2002): 5766-74, <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf562>.
- <sup>41</sup> N. Carlesso, D. A. Frank, et J. D. Griffin, « Tyrosyl Phosphorylation and DNA Binding Activity of Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) Proteins in Hematopoietic Cell Lines Transformed by Bcr/Abl », *The Journal of Experimental Medicine* 183, n° 3 (1 mars 1996): 811-20, <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.811>.
- <sup>42</sup> Bella Patel et al., « Mouse Xenograft Modeling of Human Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Provides Mechanistic Insights into Adult LIC Biology », *Blood* 124, n° 1 (3 juillet 2014): 96-105, <https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-549352>.
- <sup>43</sup> Peter J. Skene, Jorja G. Henikoff, et Steven Henikoff, « Targeted in Situ Genome-Wide Profiling with High Efficiency for Low Cell Numbers », *Nature Protocols* 13, n° 5 (2018): 1006-19, <https://doi.org/10.1038/nprot.2018.015>.
- <sup>44</sup> Peter J. Skene, Jorja G. Henikoff, et Steven Henikoff, « Targeted in Situ Genome-Wide Profiling with High Efficiency for Low Cell Numbers », *Nature Protocols* 13, n° 5 (2018): 1006-19, <https://doi.org/10.1038/nprot.2018.015>.
- <sup>45</sup> Skene, Henikoff, et Henikoff, « Targeted in Situ Genome-Wide Profiling with High Efficiency for Low Cell Numbers ».
- <sup>46</sup> Jennifer Richmond et al., « Acute Sensitivity of Ph-like Acute Lymphoblastic Leukemia to the SMAC-Mimetic Birinapant », *Cancer Research* 76, n° 15 (01 2016): 4579-91, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0523>.
- <sup>47</sup> Candace J. Poole et Jan van Riggelen, « MYC-Master Regulator of the Cancer Epigenome and Transcriptome », *Genes* 8, n° 5 (13 mai 2017), <https://doi.org/10.3390/genes8050142>.
- <sup>48</sup> Mertz et al., « Targeting MYC Dependence in Cancer by Inhibiting BET Bromodomains »; Delmore et al., « BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc ».
- <sup>49</sup> Marie-Magdelaine Coudé et al., « BET Inhibitor OTX015 Targets BRD2 and BRD4 and Decreases C-MYC in Acute Leukemia Cells », *Oncotarget* 6, n° 19 (10 juillet 2015): 17698-712, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4131>.
- <sup>50</sup> Weiping Li et al., « Targeting MYC Activity in Double-Hit Lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 Rearrangements with Epigenetic Bromodomain Inhibitors », *Journal of Hematology & Oncology* 12, n° 1 (09 2019): 2, <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0761-2>.

- 
- <sup>51</sup> Poole et van Riggelen, « MYC-Master Regulator of the Cancer Epigenome and Transcriptome ».
- <sup>52</sup> Richmond et al., « Acute Sensitivity of Ph-like Acute Lymphoblastic Leukemia to the SMAC-Mimetic Birinapant ».
- <sup>53</sup> J. Etkin et al., « Antileukemic Activity of Nuclear Export Inhibitors That Spare Normal Hematopoietic Cells », *Leukemia* 27, n° 1 (janvier 2013): 66-74, <https://doi.org/10.1038/leu.2012.219>.
- <sup>54</sup> Christopher J. Walker et al., « Preclinical and Clinical Efficacy of XPO1/CRM1 Inhibition by the Karyopherin Inhibitor KPT-330 in Ph+ Leukemias », *Blood* 122, n° 17 (24 octobre 2013): 3034-44, <https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-495374>.
- <sup>55</sup> Yubing Zhou et al., « Expression and Therapeutic Implications of Cyclin-Dependent Kinase 4 (CDK4) in Osteosarcoma », *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease* 1864, n° 5 Pt A (mai 2018): 1573-82, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.02.004>.

---

## SERMENT DE GALIEN

*Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :*

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit 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, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ 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 d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.*