



HAL
open science

Modulation du potentiel redox et hémopathies malignes : de l'étude préclinique d'un inhibiteur des aldéhydes déshydrogénase à l'essai de phase I

Julien Colle

► **To cite this version:**

Julien Colle. Modulation du potentiel redox et hémopathies malignes : de l'étude préclinique d'un inhibiteur des aldéhydes déshydrogénase à l'essai de phase I. Cancer. Aix-Marseille Université, 2021. Français. NNT : 2021AIXM0548 . tel-04419403

HAL Id: tel-04419403

<https://hal.science/tel-04419403v1>

Submitted on 26 Jan 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Modulation du potentiel redox et hémopathies malignes : **de l'étude préclinique d'un inhibiteur des aldéhydes** **déshydrogénase à l'essai de phase I.**

Résumé

Partie 1 : Généralité sur la LAM :

I. **Diagnostic / épidémiologie**

1. Diagnostic positif et de gravité
2. Pathogénèse

II. **Traitements d'induction**

1. Traitement de première ligne
 - a. LAM 3
 - b. LAM non M 3
 - i. LAM CBF
 - ii. LAM non CBF
2. Chimiothérapie intrathécal
3. Traitement non intensif
4. Allogreffe de CSH

III. **Facteurs pronostics**

1. Facteur pronostic lié à la maladie
 - a. Facteur génétique
 - i. Risque cytogénétique
 - ii. Statut mutationnel
 - b. Mutation épigénétique
2. LAM secondaire
 - a. Secondaire à un ATCD hématologique
 - b. Secondaire à un traitement
3. Micro-environnement leucémique
 - a. Cellules souches leucémiques
4. Autres biomarqueurs

Partie 2 : Modulation redox au profit de la guérison :

Introduction

I. **Les voies redox dans la LAM :**

1. Base scientifique

- a. La reprogrammation métabolique mitochondriale
- b. Les ROS dans tout leur état :
 - i. Effet seuil
 - ii. Peroxydation lipidique
- 2. Potentiel red/ox après traitement
 - a. Quels sont les thérapeutiques qui modifient le potentiel Red/ox
- 3. Les ALDH dans la LAM
- 4. Le GSH dans la LAM
- 5. Régulation du potentiel red/ox

II. Le Dimate :

- 1. Travaux déjà effectués
- 2. Mode d'action

III. Résultats expérimentaux :

Modulation in vitro des voies redox:

- 1. Variations des ROS/ALDH par le traitement :
- 2. Mécanisme de modification du potentiel redox in vitro:
 - a. Matériel et méthode
 - i. Détection des ROS
 - ii. ALDH
 - iii. Peroxydation lipidique
 - b. Résultats
 - i. Etude par cytométrie de flux des modifications ALDH/ROS/péroxydation lipidique post Aracytine
- 3. Vers une future étude de Synergie
 - a. Effets du Dimate sur les lignées cellulaires

Evaluation ex vivo des voies redox comme biomarqueurs prédictifs de l'efficacité du DIMATE et pronostic:

- 1. Mise au point de Biomarqueurs prédictifs et pronostics à partir de données patients :
 - a. Matériel et méthode :
 - i. Echantillons patients
 - ii. Isolement cellulaire CD 34+
 - iii. Viabilité cellulaire
 - iv. Aldefluor
 - v. Détection des ROS
 - b. Population
 - c. Résultats
 - i. ROS et ALDH comme biomarqueur de pronostic dans la LAM :

- ii. ROS comme biomarqueurs prédictifs de l'efficacité du DIAMTE
- iii. Courbe de survie

Partie 3 : Système immunitaire :

I. Introduction

II. Système immunitaire et LAM :

1. Contexte scientifique
2. Equilibre Redox au sein des cellules immunitaires :
 - a. Cellules Immunosuppressive
 - i. LT régulateur
 - ii. MDCS
 - b. Immunité acquise
 - i. NK
 - c. Immunité adaptative
 - i. LT
 - ii. LB

III. Principaux résultats expérimentaux :

1. Matériel et méthode
 - a. Échantillons de sang humain
 - b. Viabilité cellulaire
 - c. Prolifération et activation des lymphocytes T
 - d. Cellules cibles
 - e. Essai d'activité des cellules NK
 - f. Rupture oxydative des leucocytes :
 - g. Analyse statistique

2. Résultats :
 - a. IC50 de DIMATE sur les PBMC sains
 - b. Evaluation de l'impact du DIMATE sur les Lymphocytes T
 - c. Impact du DIMATE sur les fonctions des NK sains
 - d. Évaluation de l'effet de DIMATE sur le burst oxydatif des granulocytes

Partie 4: Essai de phase I du DIMATE dans les leucémies aiguës / promotion AdvancedBioDesign

I. Méthodologie

1. Définitions :
 - a. CTCAE,
 - b. MTD
 - c. RP2D
 - d. 3+3
 - e. Règles DLT

2. DLT hématologique et non hématologique
 - a. Sur le plan hématologique
 - b. Sur le plan non hématologique

II. Organisation de l'essai clinique

1. Partie A : DAS
2. Partie B : MAD (première semaine et 3 semaines de prolongation)
3. Partie C : RP2D

III. Réunions de sécurité et comités de sécurité

Conclusion

Articles scientifiques

Tableaux et Figures :

Tableau 1 : Caractéristiques morphologiques et immunophénotypiques des blastes prises en compte dans la classification FAB 1976 des LAM

Tableau 2 : Classification OMS 2016 des LAM.

Tableau 3 : Bilan clinique et paraclinique au diagnostic d'une LAM, selon les recommandations ELN 2017

Tableau 4 : Population générale

Tableau 5 : Caractéristique des patients de l'analyse univariée de survie

Tableau 6 : Résumé des types cellulaires et de la méthodologie dans le cadre de l'immunomodulation avec le DIMATE

Figure 1 : Distribution des sous-types cytogénétiques et moléculaires chez les adultes jeunes atteints de LAM

Figure 2 : Complexité mutationnelle de la LAM.

Figure 3 : Aires de chevauchements thérapeutiques possibles des nouveaux agents indiqués en traitement de 1^{ère} ligne d'une LAM

Figure 4 : Projection des survies relatives à 5 ans des patients atteints de LAM en fonction de la période et de l'âge

Figure 5 : Survie globale en fonction des classifications ELN 2017 et 2010.

Figure 6 : Survie globale chez des patients atteints de LAM âgés de plus de 60 ans

Figure 7 : Evolution du niveau d'expression d'ALDH après traitement par DIMATE

Figure 8 : Formation d'adduit avec MDA et HNE en fonction du traitement par DIMATE

Figure 9 : Evolution de l'activité Caspase 3/7 avec le temps en fonction du traitement par DIMATE ou placebo

Figure 10 : Evolution de la MFI ROS des cellules tumorales en fonction du nombre de lignes de traitement reçues

Figure 11 : Evolution de l'activité ALDH1 dans les cellules tumorales en fonction du nombre ligne de traitement reçu

Figure 12 : Comparaison sang/moelle pour ROS et ALDH

Figure 13 : Evolution des profils redox après incubation par l'ARACYTINE

Figure 14 : Evaluation pré et post traitement par AraC dans 10 lignées.

Figure 15 : Viabilité cellulaire des différentes lignées cellulaires en fonction de doses croissantes de DIMATE

Figure 16 : ELN en fonction des ROS, ALDH dans l'échantillon de patient et sur la base de donnée du TCGA

Figure 17 : Evolution du profil redox en fonction de la réponse de la maladie

Figure 18 : Corrélation des IC50 du DIMATE en fonction du profil redox

Figure 19 : Courbe de survie

Figure 20 : Effet du DIMATE sur la viabilité et la prolifération des cellules mononuclées du sang périphérique

Figure 21 : Effet du DIMATE sur la prolifération des lymphocytes T et sur la sécrétion d'IL-2

Figure 22 : Effet du DIMATE sur la fonction lyse des NK.

Figure 23 : Effet du DIMATE sur la capacité oxydative des neutrophiles.

Figure 24 : Partie A essai de phase 1

Figure 25 : Partie B de l'essai de phase 1

RESUME :

La leucémie aiguë myéloïde (LAM) est la leucémie aiguë la plus fréquente chez l'adulte, avec un âge médian de 69 ans. La plupart des patients atteints de LAM obtiennent une rémission complète après une chimiothérapie d'induction standard¹. Cependant, la majorité d'entre eux rechutent par la suite et meurent des suites de la maladie. Le traitement de la LAM reste globalement le même depuis 30 ans même si ces dernières années plusieurs traitements ont vu le jour. Malgré les progrès des thérapies moléculaires ciblées, le pronostic reste sombre. Les cellules leucémiques développent une résistance rapide à ces différents traitements en raison de l'hétérogénéité tumorale, de l'insensibilité des cellules souches leucémiques² aux traitements conventionnels et de l'adaptation des différentes voies moléculaires à la pression sélective. La LAM demeure un besoin médical majeur non satisfait.

La famille enzymatique des aldéhydes déshydrogénases (ALDH), dans les cellules leucémiques humaines, agit comme médiateur de la résistance à plusieurs médicaments³ et des niveaux élevés d'activité de l'ALDH prédisent une inefficacité du traitement⁴. La famille de gènes ALDHs contient au moins 19 isoformes qui métabolisent les rétinoïdes, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les aldéhydes endogènes et exogènes⁵. Les ROS ont de nombreuses fonctions dans les systèmes biologiques, comme la peroxydation des lipides insaturés⁶, qui entraîne l'accumulation intracellulaire d'aldéhydes hautement apoptogènes. Parmi ces différents aldéhydes apoptogènes, deux sont particulièrement pertinents : l'aldéhyde malondialdéhyde (MDA), qui est un agent de réticulation de la chromatine⁷, et le 4-hydroxynonéal (HNE), qui induit directement une apoptose cellulaire⁸. HNE affecte le statut d'oxydoréduction cellulaire, la mort cellulaire en appauvrissant le glutathion (GSH). L'appauvrissement en GSH induit une crise mitochondriale avec production de ROS mitochondriaux⁹ et activation de la voie d'apoptose médiées par les caspases¹⁰. Les différentes isoformes des ALDH (ALDH1, 2 et 3) contrôlent les niveaux de MDA et HNE¹¹. Par conséquent, grâce à la modulation de la concentration intracellulaire de HNE, les ALDHs contrôlent ce système antioxydant redox (GRS) basé sur le GSH et le statut redox cellulaire¹².

Les cellules cancéreuses se protègent de l'effet apoptogène de ces aldéhydes en augmentant l'activité ALDH qui les oxydent en leurs acides carboxyliques non apoptogènes¹³. Le DIMATE est un inhibiteur actif, compétitif et irréversible des ALDH 1 et 3. In vitro et in vivo, le DIMATE a une activité cytotoxique sur les cellules souches leucémiques et les blastes matures tout en épargnant les cellules souches hématopoïétiques saines¹⁴. L'effet cytotoxique de DIMATE est dû à l'inhibition de l'activité de l'ALDH qui entraîne l'accumulation d'aldéhydes apoptogènes et de ROS. Les ROS peuvent induire différents types de mort des cellules cancéreuses : l'apoptose, la nécroptose¹⁵ et une mort oxydative non apoptotique, dépendant du fer : la ferroptose¹⁶. Les cellules cancéreuses sont plus dépendantes de ces mécanismes antioxydants pour leur survie cellulaire et, par conséquent, plus vulnérables aux composés qui suppriment les principaux systèmes antioxydants des cellules. L'induction d'une mort préférentielle sur les cellules cancéreuses basée sur un état redox différentiel dans les cellules normales et malignes semble être une nouvelle approche thérapeutique. De nombreuses chimiothérapies conventionnelles entraînent une augmentation du niveau de ROS intracellulaire.

Cependant, les cellules cancéreuses développent rapidement une résistance aux médicaments par une adaptation redox de leur métabolisme, de même que l'hétérogénéité tumorale et les phénomènes de dérive clonale rendent l'efficacité des thérapies ciblées sur des anomalies moléculaires (mutation FLT3, IDh2 ou IDH2 par exemple) la plupart du temps de courte durée¹⁷. Un traitement s'attaquant à une particularité commune à l'ensemble des cellules leucémiques, y compris les cellules souches leucémiques, et correspondant à un processus indispensable à la survie tumorale, nous paraît être une voie prometteuse.

Nous développerons cette thèse en 4 temps :

- 1) par un article donnant notre vision des mécanismes d'échappement tumoral aux thérapies ciblées grâce à une approche préliminaire par l'analyse tumorale en technique de « cellule seule », nous émettons des hypothèses quant aux options stratégiques de traitement des leucémies,
- 2) nous tenterons de comprendre les altérations redox complexes des cellules blastiques tout en identifiant le mécanisme d'action du DIMATE. Nous nous efforcerons d'identifier de nouveaux biomarqueurs dans la LAM en relation avec le statut redox des

cellules leucémiques grâce à une vaste cohorte prospective d'échantillons de patients atteints de LAM, tout en cherchant des tests-compagnons de la réponse aux médicaments,

- 3) nous nous intéresserons à l'impact du DIMATE sur les effecteurs du système immunitaire, puisque les approches d'immunothérapie sont devenues à l'heure actuelle complémentaire des chimiothérapies,
- 4) l'ensemble de ce travail étant la base de l'essai clinique de phase I que nous espérons débuter fin 2021-2022 (PI et coordonateur national, Pr R. Costello ; responsable essai CLIPP AP-HM, Dr J Colle).

PARTIE I Généralité sur les LAM :

Leucémies aiguës myéloïdes : Généralités

I. Diagnostic

1. Diagnostic positif et de gravité

Les leucémies aiguës constituent un ensemble de pathologies liées à la prolifération de blastes s'accumulant dans la moelle, le sang ou d'autres organes. Dans le cadre des leucémies aiguës myéloïdes, ces blastes sont des progéniteurs des cellules sanguines de la lignée myéloïde, qui sont bloqués à un stade de maturation et dont la capacité de différenciation normale est altérée. Sans traitement, les LAM sont toujours mortelles. Le décès est directement lié à l'insuffisance médullaire induite par l'envahissement blastique, les cytopénies entraînant des complications infectieuses ou hémorragiques.

Sur le plan clinique, il n'existe pas de signe spécifique d'une LAM. La présentation peut être uniquement biologique avec découverte d'anomalies sur l'hémogramme ou plus bruyante liées à des complications. Devant toute suspicion de LAM, il convient de transférer le patient dans un centre de référence spécialisé.

Les signes cliniques possibles comprennent principalement 3 syndromes en lien avec l'infiltration médullaire : infectieux, anémique ou hémorragique. Le syndrome hémorragique peut être plus fréquent en cas de LAM3, entraînant fréquemment une CIVD. Il existe parfois des douleurs osseuses. Un syndrome tumoral peut également être présent, il peut s'agir d'une atteinte splénique (15% des cas), hépatique, splénique, ganglionnaire ou méningée. Des lésions cutanéomuqueuses sont possibles telles que les lésions d'hématodermie (leucémides) ou une hypertrophie gingivale (plus particulièrement dans des LAM4 et 5). Enfin dans de très rares cas, la maladie est uniquement extra-médullaire (sarcome myéloïde). Une altération de l'état général, d'origine multifactorielle est fréquente.

La présentation clinique aiguë de la maladie impose souvent une prise en charge médicale rapide. Le sepsis sévère, la CIVD et la leucostase représentent des urgences vitales qui nécessitent un transfert en centre spécialisé.

Le diagnostic positif d'une LAM est biologique et repose sur un examen cytologique et morphologique du sang et de la moelle ainsi que des analyses immuno-phénotypiques des blastes. Si le nombre de blastes circulants dépasse les 1000/ μ L, les analyses génétiques peuvent être effectuées sur blastes sanguins. Une blastose sanguine absente n'élimine pas un diagnostic de LAM.

En cas d'échec d'un myélogramme, une biopsie ostéo-médullaire peut être réalisée. Si une atteinte extra-médullaire est suspectée, un TEP-TDM doit être pratiqué. Si une atteinte du SNC est évoquée, une imagerie cérébrale doit être faite pour éliminer un saignement intracrânien, une atteinte méningée ou un processus expansif intracrânien ou médullaire, l'IRM constitue un examen de choix dans le cadre des atteintes méningées. En cas d'atteinte neurologique inexplicée et après correction des troubles de l'hémostase ou de la coagulation, une ponction lombaire (PL) doit être pratiquée. Cette PL pourra être réalisée en l'absence de signes neurologiques, au terme de la phase d'induction après obtention de la RC1, dans les cas où l'atteinte neurologique est à risque : LAM à contingent monocyttaire ou mixte, LAM hyperleucocytaire, atteinte extra-médullaire, LAM promyélocytaire de haut risque. Les autres signes biologiques d'une LAM retrouvés sur une NFS incluent une anémie (90% des cas) arégénérative normochrome normocytaire ou plus rarement macrocytaire. Il existe très fréquemment une thrombopénie (80% des cas) pouvant être associée à l'envahissement médullaire ou à une CIVD. Le nombre de globules blancs est variable, il peut exister une neutropénie sévère ou à l'inverse une polynucléose.

Un pourcentage de blastes supérieur à 20% dans le sang ou dans la moelle permet un diagnostic de LAM selon la classification OMS 2016¹⁸. L'analyse morphologique et cytochimique est une étape clé pour typer la LAM selon la classification franco-américano-britannique¹⁹. (tableau 1). La classification FAB permet de différencier les blastes de LAM de ceux de LAL et de typer plus précisément les blastes myéloïdes en myéloblastes, monoblastes, proérythroblastes ou mégacaryoblastes. Cette classification date de 1976, et été remplacée, par la classification OMS¹⁸ (Tableau 2) dont la dernière version de 2016, intègre mieux

l'hétérogénéité des LAM en y associant la recherche d'anomalies cytogénétiques et moléculaires. En pratique clinique, les 2 classifications sont utilisées.

Il est à noter qu'un diagnostic de LAM peut depuis peu, être porté en cas de blastose < à 20%, en présence de certaines altérations caryotypiques ou moléculaires récurrentes qui sont pathognomonique de LAM. Il s'agit de la translocation t(15;17) impliquant le transcrite de fusion PML-RARA qui définit la LAM3, de la translocation t(8;21) produisant le transcrite de fusion RUNX1-RUNXT1, de l'inversion du 16 ou la translocation t(16;16) aboutissant au transcrite de fusion CBFβ-MYH11. Une analyse phénotypique des blastes par cytométrie de flux peut aider à confirmer le diagnostic et le sous-type de LAM.

Tableau 1 : Caractéristiques morphologiques et immunophénotypiques des blastes prises en compte dans la classification FAB 1976 des LAM. D'après Bennett et al.(19)

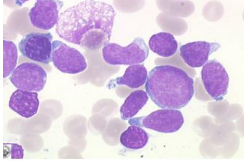
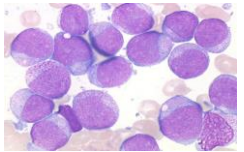
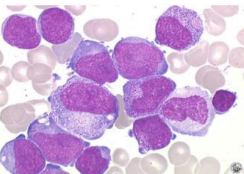
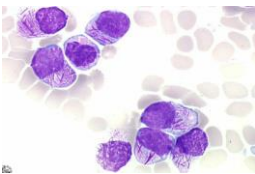
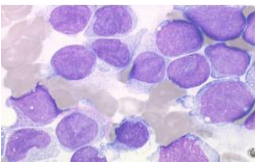
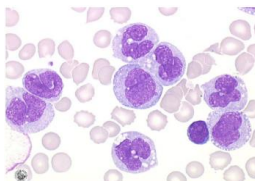
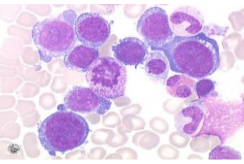
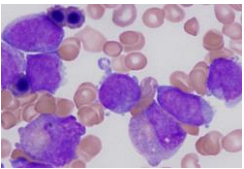
Sous-type	Morphologie	Immunophénotype	
M0 leucémie aigue myéloblastique avec différenciation minimale		Blastes de taille moyenne, noyau arrondi, chromatine fine, cytoplasme basophile non granuleux, nucléole proéminent Absence de différenciation myeloïde, Absence de granulation ou de corps d'Auer MPO - Immunophénotype indispensable	CD13+ CD33+ CD117 + CD11b/c -, CD14-, CD15-
M1 Leucémie aigue myéloblastique sans maturation		Myéloblastes peu différenciés, de taille moyenne à rapport nucléocytoplasmique élevé, noyau arrondi avec chromatine immature, dispersée Un ou plusieurs nucléoles proéminents Absence de granulations ou de corps d'Auer MPO +	CD13+ CD33+ CD117 + CD11b/c -, CD14-, CD15- CD64-, CD65-, MPO +
M2 Leucémie aigue myéloblastique avec maturation		Blastes de taille petite à moyenne avec ratio nucléocytoplasmique élevé Chromatine immature, dispersée, un ou plusieurs nucléoles, cytoplasme basophile Granulations azurophiles possibles Batonnet d'Auer fréquent MPO +	CD13 + CD33+ CD15+ CD11c+ CD65 +
M3 Leucémie promyélocytaire		Noyau souvent réniforme, irrégulier ou bilobé Cytoplasme faiblement basophile en raison des granulations abondantes, intensément azurophiles. Forme classique : Granulations très riches et cohésives avec aspect de fagot sur de nombreuses cellules Forme variante hypogranulaire : De rares blastes contiennent de nombreuses granulations et/ou des fagots d'Auer	CD13 + CD33+ CD15- CD65-
M4 Leucémie aigue myélo-monocytaire		Blastes de grande taille à rapport nucléocytoplasmique modéré et basophilie variable Noyau arrondi, réniforme ou irrégulier Nucléoles habituellement abondant Morphologie évocatrice de promonocyte	CD13 + CD33+ CD15+ CD65+ +/- marqueurs monocytaires
M5 Leucémie aigue monocytaire		M5a: Morphologie monoblastique (>80% de monoblastes) Blastes de grande taille avec nucléole arrondi et périphérique, chromatine immature (1 à 3 nucléoles) et cytoplasme modérément à intensément basophile Possibles corps d'Auer et/ou des granulations M5b : Morphologie monocytaire Association de promonocytes et de monoblastes vacuolés	CD33+ CD117+ CD13+/- CD65+/- Au moins 2 marqueurs monocytaires (CD14, CD11b/c, CD64, CD68, CD4) CD15+ CD11c+ CD65 +
M6 Leucémie aigue érythrocytaire		M6a : Composante érythroblastique prédominante, >50% de précurseurs érythroïdes et > 20% de myéloblastes M6b : Leucémie érythroïde pure définie par un contingent érythroïde >80% et < 3% de cellules myéloïdes	CD117+ CD15 + Glycophorine et hémoglobine A + (M6a), CD36 (M6b)
M7 Leucémie aigue mégacaryocytaire		Blastes polymorphiques, très immatures > 50% des blastes sont de la lignée mégacaryocytaire Micromégacaryocytes (non comptés dans les blastes) : Petites cellules, un ou deux noyaux ronds, chromatine condensé, cytoplasme mature Mégacaryoblastes : Taille petite à moyenne, rapport nucléocytoplasmique élevé, noyau rond parfois légèrement irrégulier ou indenté, chromatine fine avec 1 à 3 nucléoles, cytoplasme basophile souvent sans granulation et pouvant montrer des bourgeons ou des pseudopodes.	> 1 glycoprotéine plaquettaire: CD41, CD61, CD42 CD13 +/- CD33 +/-

Tableau 2 : Classification OMS 2016 des LAM. D'après Arber et al. (18)

LAM AVEC ANOMALIES CYTOGÉNÉTIQUES RÉCURRENTES
<p>LAM avec t(8;21) (q22;q22) ; RUNX1 - RUNX1T1</p> <p>LA promyélocytaire avec PML - RARA</p> <p>LAM avec inv(16) (p13.1q22) ou t(16 ;16) (p13.1q22) ; CBFβ - MYH11</p> <p>LAM avec t(9;11) (p22;q23) ; MLLT3 - KMT2A (MLL)</p> <p>LAM avec t(6;9) (p23;q34) ; DEK - NUP214</p> <p>LAM avec inv(3) (q21q26.2) ou t(3;3) (q21;q26.2) ; GATA2, MECOM</p> <p>LAM (mégacaryoblastique) avec t(1;22) (p13;q13) ; RBM15 - MKL1</p> <p>LAM avec mutation NPM1</p> <p>LAM avec mutation bi allélique CEBPA</p> <p>Entités provisoires : LAM avec mutation RUNX1 et LAM avec BCR-ABL1</p>
LAM AVEC ANOMALIES ASSOCIÉES AUX MYÉLODYSPLASIES
<p>Soit faisant suite à un syndrome myélodysplasique ou un syndrome myéloprolifératif/dysplasique</p> <p>Soit avec anomalie(s) cytogénétique(s) de syndrome myélodysplasique : Anomalies équilibrées (-7/del(7q), del(5q)/t(5q, i(17q)/t(17p), -13/del(13q), del(11q), del(12p)/t(12p), idic(X)(q13)) ou déséquilibrées : t(11;16)(q23.3;p13.3), t(3;21)(q26.2;q22.1), t(1;3)(p36.3;q21.2), t(2;11)(p21;q23.3), t(5;12)(q32;p13.2), t(5;7)(q32;q11.2), t(5;17)(q32;p13.2), t(5;10)(q32;q21.2), t(3;5)(q25.3;q35.1)</p>
NÉOPLASIES MYÉLOÏDES POST CHIMIOTHÉRAPIE
<p>Correspondent soit à une tAML soit à un tMDS</p>
LAM SANS AUTRE SPÉCIFICATION (NOS)
<p>LA myéloblastique avec différenciation minimale</p> <p>LA myéloblastique sans maturation</p> <p>LA myéloblastique avec maturation</p> <p>LA myélomonocytaire</p> <p>LA monoblastique / monocytaire</p> <p>LA érythroïde pure [l'érythroleucémie (= ancienne LAM6) disparaît en 2016]</p> <p>LA mégacaryoblastique</p> <p>LA myéloblastique à composante basophile</p> <p>LA avec myélofibrose (panmyélose aiguë)</p>
SARCOME GRANULOCYTAIRE
PROLIFÉRATIONS MYÉLOÏDES ASSOCIÉES À LA TRISOMIE 21 CONSTITUTIONNELLE
<p>Réaction leucémoïde transitoire</p> <p>LAM associée à la trisomie 21 constitutionnelle</p>

D'autres examens sont réalisés à visée pronostique et concernent notamment les informations cytogénétiques requises dans la stratification pronostique des patients selon les classifications ELN 2017²⁰ et les critères MRC²¹

Ces recherches concernent les mutations FLT3-ITD et TKD, NPM1, CEBPA, et plus récemment TP53, RUNX1, ainsi qu'ASXL1. La recherche de mutations d'IDH1 et 2 et c-kit peuvent être parfois indiquées car elles peuvent avoir des conséquences thérapeutiques, notamment dans le cadre de rechutes, selon les recommandations NCCN 2018²² et par les guidelines de l'ASH le recommandent²³.

La recherche de réarrangement géniques peut être faite dès le diagnostic en cas de morphologie évocatrice d'une certaine forme de LAM avec cytogénétique discordante, en cas de diagnostic moléculaire urgent ou en cas d'échec de caryotype. Elle concerne la recherche de transcrits PML-RARA, CBFβ-MYH11, RUNX1-RUNX1T1 et BCR-ABL1 par qRT-PCR.

La génomique des LAM ne cesse de s'évoluer plus et, le spectre des altérations génétiques dans la LAM est maintenant accessible par NGS ou par panels multiplex. Ces outils permettent une meilleure stratification pronostique, ainsi que l'identification de cibles thérapeutiques potentielles, pouvant être intégrée à une stratégie de thérapie personnalisée.

L'hétérogénéité cytogénétique et moléculaire des LAM est illustrée par les figures 1^{24, 25}.

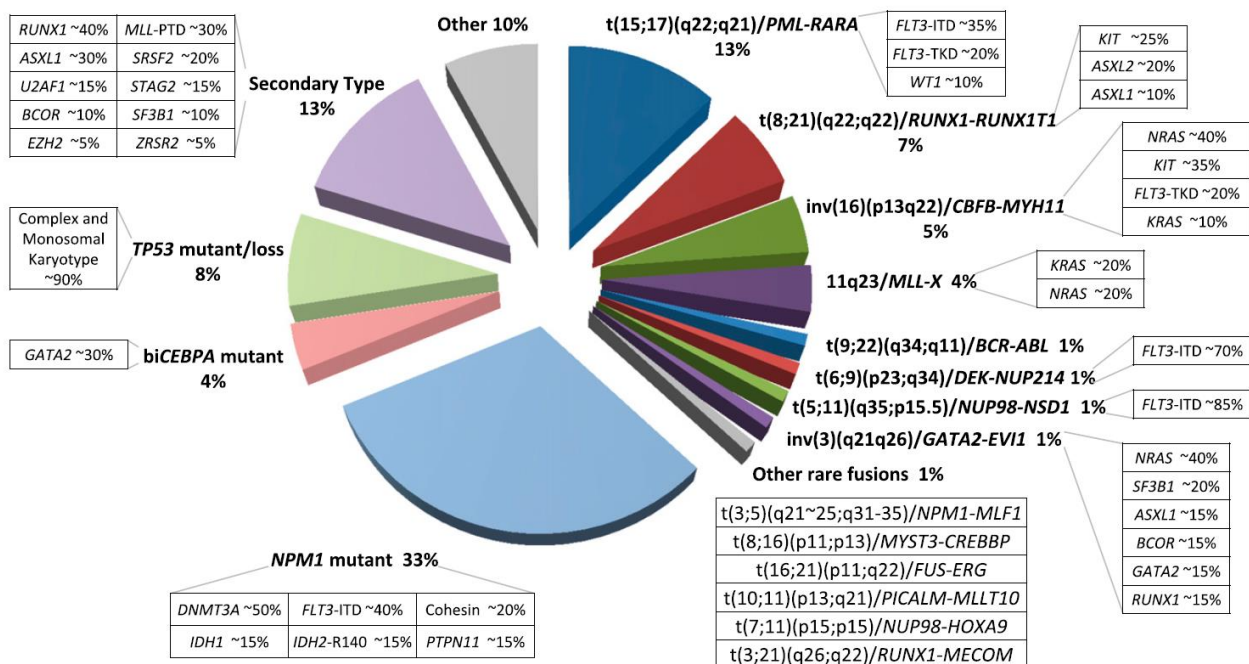


Figure 1 : Distribution des sous-types cytogénétiques et moléculaires chez les adultes jeunes atteints de LAM. D'après Grimwade et al. (7)

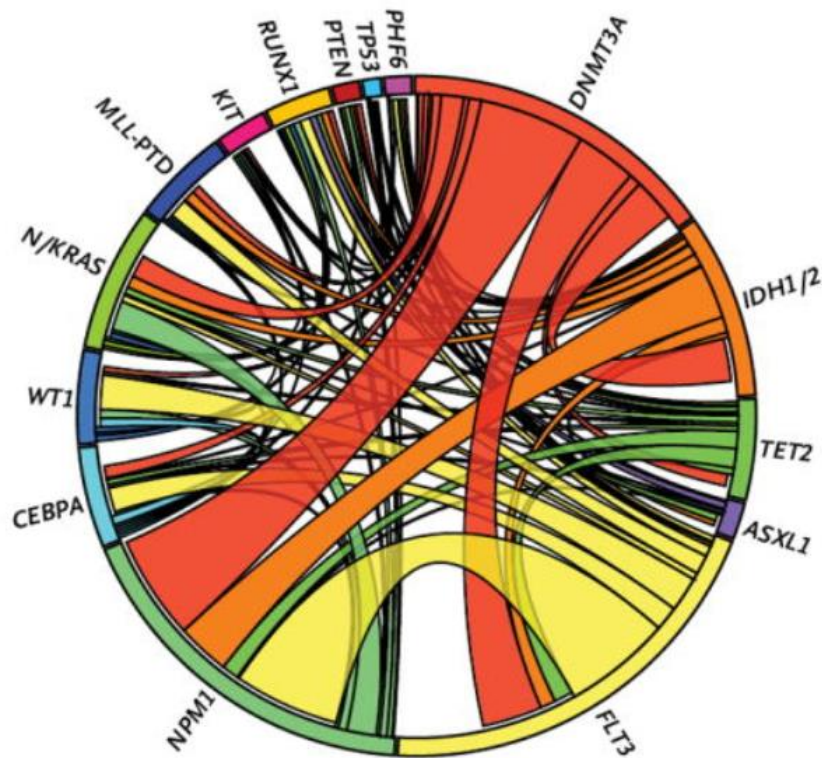


Figure 2 : Complexité mutationnelle de la LAM.

Diagramme de Circos illustrant la fréquence relative et la co-occurrence de 18 mutations chez des patients nouvellement diagnostiqués d'une LAM. La longueur de l'arc représente la fréquence de mutations dans le premier gène, la largeur du ruban correspond au pourcentage de patients ayant aussi une mutation dans le second gène. Analyse menée sur 398 patients âgés de moins de 60 ans inclus dans l'essai ECOG E1900.

Avant de choisir un type de traitement étiologique, il convient de réaliser un bilan complet à visée pré-thérapeutique comprenant une évaluation de la fonction rénale et hépatique, et cardiaque (ECG, ETT ; FEVG < 45% constitue une contre-indication à l'utilisation d'anthracyclines, remplacé par du topotécan) ainsi qu'un bilan virologique (sérologies VIH, VHB, VHC). Pour tous les patients potentiellement candidats à une allogreffe de CSH, un typage HLA doit être réalisé. Un typage HLA des membres de la famille doit également être pratiqué en cas de potentielle indication et faisabilité d'une allogreffe de CSH.

L'ensemble des examens recommandés par l'ELN au diagnostic d'une LAM sont résumés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Bilan clinique et paraclinique au diagnostic d'une LAM, selon les recommandations ELN 2017 (20).

TESTS POUR ETABLIR LE DIAGNOSTIC
NFS-Plaquettes, frottis sanguin Myélogramme Biopsie de moelle osseuse (si ponction blanche) Immunophénotypage
ANALYSES GENETIQUES
Cytogénétique (préférentiellement réalisée dans les 5 à 7 jours suivant le diagnostic, 20 métaphases au minimum sont requises pour définir un caryotype normal) Recherche de mutations dont : NPM1, CEBPA, RUNX1, FLT3, TP53, ASXL1 Recherche de réarrangement génique : PML-RARA, CBFB-MYH11, RUNX1-RUNX1T1, BCR-ABL1, et autres gènes de fusion (si disponible)
AUTRES TESTS ET PROCEDURES POUR LE DIAGNOSTIC
Démographie et historique médical Historique familial détaillé Historique hématologique personnel Performans status (échelle OMS) Analyse des comorbidités Biochimie, coagulation, tests urinaires Test sérique de grossesse Information sur les cryoconservations d'ovocytes et de sperme Évaluation de l'éligibilité pour une allogreffe de CSH (y compris le typage HLA, sérologie CMV) Tests VIH-1, hépatites A, B, C Radiographie thoracique, ECG 12 dérivation, échocardiographie (ou ventriculographie isotopique MUGA sur indication) PL (imagerie cérébrale préalable si symptomatologie neurologique) Stockage biothèque
EVALUATION DE LA REPONSE PAR RT-qPCR ou CMF
RT-qPCR pour mutation NPM1, CBFB-MYH11, RUNX1-RUNX1T1, BCR-ABL1, autres gènes de fusion (si disponible) CMF

2. Pathogénèse

De récentes avancées dans la biologie cellulaire et dans la génomique ont permis depuis ces dernières années une meilleure compréhension de la manière dont une LAM se développe.

Selon une hypothèse, le développement d'une LAM impliquerait un modèle en 2 temps (« hits »)²⁶

- Apparition en premier lieu d'une altération génétique de niveau 1 (mutations de classe 1) : mutations impliquant FLT3-ITD, FLT3-TKD, c-kit, RAS, JAK2 ou SHP2. Ces mutations confèrent un avantage en termes de survie ou de prolifération des blastes.

- Altération génétique de niveau 2 (mutations de classe 2) altérant la différenciation myéloïde normale (PML/RARA, RUNX1/RUNX1T1, CBFβ/MYH11, NPM1, CEBPA, MLL).

La majorité des LAM ne peuvent se développer que si les 2 conditions sont réunies, néanmoins certaines, notamment avec mutations des chromosomes 5 et 7 impliquent une inactivation de gènes suppresseurs de tumeur liés à des mécanismes épigénétiques (méthylation de l'ADN).

Quoique la physiopathologie de la LAM reste encore débattue, les cellules souches leucémiques dériveraient de cellules souches hématopoïétiques ou de progéniteurs qui auraient acquis par événement mutationnel des capacités d'auto-renouvellement. De nouvelles altérations génétiques, portées par les progéniteurs des cellules souches leucémiques expliquerait l'hétérogénéité clonale des LAM.

La plupart des LAM se développent sur des individus en bonne santé mais dans certains cas il existe des facteurs de risque sous-jacents. Parmi eux, on retrouve des formes de LAM secondaire à des expositions environnementales, dont le benzène, les pesticides et les radiations ionisantes. Certaines LAM peuvent également se développer dans le cadre de prédispositions génétiques telles que la trisomie 21 (risque de développer une LAM dans l'enfance multiplié par 500, 14% des LAM de l'enfant²⁷, ou dans d'autres pathologies plus rares (déficits immunitaires

congénitaux, maladie de Fanconi, neurofibromatose de type 1). Les LAM associées à des mutations germinales (présentes dès la naissance) font partie du spectre des syndromes héréditaires d'hémopathies myéloïdes, elles impliquent souvent les gènes GATA2, RUNX1 ou DDX41. Une recherche de ces mutations dans la famille d'un cas index peut être alors indiquée^{28, 29}.

A l'inverse des « LAM de novo », il existe des cas de LAM secondaires, à un traitement (« therapy-related AML ou tAML ») c'est-à-dire développées dans les suites de l'administration de chimiothérapie ou de radiothérapie ou encore secondaires à un antécédent hématologique, c'est-à-dire un syndrome myélodysplasique (SMD) ou un syndrome myélo-prolifératif (SMP), ces dernières sont appelées LAM secondaires ou LAM secondaires à un antécédent hématologique. Les tAML concernent 10% des nouveaux cas de LAM.

Le taux d'incidence de t-LAM est en augmentation ces dernières années en raison du développement de traitements adjuvants en cancérologie et du fait d'une plus grande proportion de patients survivants³⁰. Cette recrudescence serait particulièrement élevée dans les lymphomes non hodgkiniens³¹. Les 2 classes de chimiothérapies les plus concernées dans les t-LAM sont les inhibiteurs de la topoisomérase (doxorubicine, idarubicine, étoposide, mithoxantrone) et les agents alkylants (cyclophosphamide, melphalan). Ces molécules sont utilisées dans une large proportion de patients atteints de tumeurs solides ou d'hémopathies.

Le sous-type rencontré le plus fréquemment survient 5 à 7 ans après l'exposition à un agent alkylant ou à une radiothérapie, il existe une association fréquente à des anomalies des chromosomes 5 et 7, un caryotype complexe ou une mutation de p53. L'exposition à des inhibiteurs de la topoisomérase est à risque de LAM dans les 1 à 3 ans, il existe sur le plan génétique des réarrangements équilibrés de MLL, RUNX1 ou PML/RARa.

L'effet des molécules ou des rayons peut entraîner des effets génotoxiques directes mais selon une hypothèse émergente, l'acquisition d'un clone myéloïde résistant au cours de la chimiothérapie, impliquant majoritairement la voie p53, favoriserait le développement d'une LAM des patients présentant une hématopoïèse clonale pré-existante³².

La CHIP (clonal haemopoiesis of indeterminate potential) a une incidence qui augmente avec l'âge et atteindrait environ 10% des patients de plus de 65 ans, elle

peut se compliquer d'hémopathies malignes dont SMD et LAM avec une fréquence d'environ 1% par an³³. Les clones associés à la CHIP peuvent acquérir de nouvelles mutations leur conférant un avantage sélectif, comme TP53³⁴ entraînant une instabilité génomique et un avantage en terme de survie. La pression de sélection qui est exercée sur les cellules hématopoïétiques du fait de l'âge ou d'un stress exogène, entrainerait une sélection de variants, qui sous l'effet d'un échappement immunitaire aboutirait au développement de la CHIP.

Il existerait 2 origines à la CHIP: CHIP développées dans les suites de l'acquisition de mutation somatiques de gènes identifiés comme drivers dans la leucémie (c'est-à-dire conférant un avantage prolifératif ou de survie), CHIP survenant par une dérive neutre stochastique touchant une partie des CSH actives³⁵. Initialement la CHIP a été définie comme la présence d'une population de cellules sanguines clonales associées à la présence d'une mutation reconnue comme driver dans les hémopathies malignes avec une (VAF) $\geq 2\%$, en l'absence de cytopénies ou de pathologies définies par l'OMS. 19 mutations possibles ont été initialement décrites mais concernent principalement DNMT3, ASXL1 et TET2.

De récentes études suggèrent qu'avec un seuil de VAF à $\geq 1\%$, le risque de LAM augmente (RR 5.4, IC95% 1.8-16.6,)³⁶. Il existe d'autres types d'hématopoïèse clonale. L'ARCH (Age-related Clonal Hematopoiesis) n'a pas été décrite comme associée à la présence de mutations drivers de La LAM mais sa distinction avec la CHIP est peut-être artificielle car l'étendu du spectre des mutations drivers dans la LAM est peut-être sous-estimée. Il est également possible de distinguer les hématopoïèses clonales non CHIP, non ARCH, qui peuvent être retrouvées en post-chimiothérapie, après radiothérapie ou après allogreffe de CSH.

La CHIP fait actuellement l'objet de nombreuses études. Une étude parue dans Nature en 2018 a montré qu'il était possible de distinguer une CHIP d'un état pré-leucémique même de nombreuses années avant la transformation leucémique³⁷.

II. Prise en charge thérapeutique de la LAM

1. Traitement étiologique de première ligne

De façon simplifiée, les individus jeunes bénéficient d'un traitement curatif comportant une polychimiothérapie s'étendant sur une durée approximative de 6 mois, comprenant une chimiothérapie d'induction nécessitant une hospitalisation de 4 à 6 semaines, du fait d'une aplasie secondaire. Le traitement d'induction est la plupart du temps suivi d'un traitement de consolidation (ou post-rémission) avec des hospitalisations de plus courtes durées. Le traitement de consolidation est guidé par le risque estimé de rechute qui dépend notamment des anomalies cytogénétiques et moléculaires, de l'échec ou non à l'obtention d'une RC1 au terme d'un premier cycle d'induction, et de facteurs liés au patient.

Une allogreffe de CSH est systématiquement discutée après obtention d'une RC1 sauf en cas de LAM de pronostic favorable et avec une MRD négative. Pour ce qui est des patients âgés, le protocole de traitement sera si possible guidé par les résultats de l'analyse cytogénétique.

Les patients non candidats à un traitement intensif peuvent bénéficier d'une inclusion dans des essais cliniques. En cas de refus ou d'inéligibilité à la participation à un essai thérapeutique, une chimiothérapie non intensive ou des traitements de support seuls peuvent être proposés.

L'arsenal thérapeutique des LAM est restreint comparativement aux autres hémopathies avec peu de nouvelles molécules ayant reçu l'AMM. Des modifications minimales des protocoles d'induction et de consolidation ont amélioré le pronostic des patients, mais des avancées thérapeutiques sont nécessaires pour augmenter la survie des patients atteints de LAM.

Actuellement les recommandations de traitement dépendent essentiellement de l'éligibilité à la réalisation d'une chimiothérapie intensive. Plusieurs facteurs sont à prendre en compte dans la décision thérapeutique, et quoique les protocoles ont des seuils fixés en fonction de l'âge chronologique des patients ; le traitement dépend en pratique de l'âge physiologique, qui prend en compte entre autres le PS, les comorbidités, les antécédents de s-AML ou de tAML et le risque cytogénétique et moléculaire.

1. Traitement de la LAM promyélocytaire (LAM3)

Il convient de distinguer le traitement des LAM promyélocytaires ou LAM3, représentant 5 à 8% des patients, qui ont un traitement et un pronostic bien distincts des autres sous-types de LAM. Les LAM3 sont définies en fonction du risque de rechute : risque standard (risque faible ou intermédiaire) ou haut risque ³⁸. Le traitement de cette forme particulière de LAM fait appel à de l'ATRA (Vesanoid) qui a montré une réduction des complications hémorragiques s'il est introduit précocement. Les résultats du protocole APL 2006 ont démontré l'intérêt de l'utilisation systématique de l'arsenic dans le traitement de première ligne des LAM3 ³⁹. Ces résultats venaient confirmés ceux de Lo Cocco et al. ⁴⁰ et ceux de l'étude anglaise AML 17 montrant qu'un traitement combinant ATRA et arsenic n'était pas différent d'un traitement combinant ATRA et idarubicine, dans les groupes de risque bas ou intermédiaire ou dans les groupes de risque élevé ⁴¹.

Actuellement les patients atteints de LAM 3 de risque standard (faible ou intermédiaire) sont traités selon le schéma anglais associant du trioxyde d'arsenic (0.3mg/kg J1 à J5 puis 0.25mg/kg 2 fois par semaine pendant 2 mois) à de l'ATRA (45mg/m² soit 1 cp/12h jusqu' à J60 ou jusqu'à RC). Les consolidations se réalisent selon un schéma différent associant de l'ATO (0.3mg/kg J1 à J5 puis 2 fois par semaine pendant 3 semaines) à de l'ATRA ((45mg/m² soit 1 cp/12h de J1 à J15 et de J29 à J43).

Pour ce qui est des LAM3 de haut risque, elles sont traitées selon le protocole APOLLO bras contrôle AIDA (**NCT02688140**) avec idarubicine 12mg/m² J1, 3, 5, 7 et ATRA 45mg/m² jusqu'à J60. Les consolidations incluent de l'idarubicine et de l'ATRA (consolidations 1 à 3) ainsi que de l'aracytine (consolidations 1 et 3). Les résultats de l'étude APOLLO sont attendus afin de déterminer l'intérêt de l'utilisation de l'ATO combiné à l'ATRA et à l'idarubicine.

2. Traitement de la LAM non M3

Les LAM non promyélocytaires sont traitées en fonction du risque établi selon l'âge, et la classification ELN. Néanmoins les informations cytogénétiques et

moléculaires étant non disponibles au diagnostic (délai de 1 à 3 semaines en fonction des examens), le traitement d'induction est choisi essentiellement en fonction de l'âge, des comorbidités, du PS et des antécédents de traitements cytotoxiques ou de MDS.

Les objectifs sont d'obtenir une RC en réduisant donc au maximum la charge leucémique et de restaurer une hématopoïèse efficace, mais également de permettre une bonne tolérance de la phase de consolidation.

D'un point de vue thérapeutique, un âge élevé (supérieur à 60 ou 65 ans en fonction des études) fait appel à des protocoles d'induction et de consolidation différents.

Quoiqu'il existe des différences minimes, la chimiothérapie d'induction des LAM non promyélocyaires fait appel le plus souvent à de la cytosine arabinoside (= aracytine ou cytarabine) et à des anthracyclines. Ce protocole d'induction est le gold standard qui a peu évolué au cours de ces dernières décennies. Des études plus récentes ont néanmoins permis de démontrer qu'il existait un bénéfice à utiliser des doses élevées de daunorubicine à l'induction⁴² ainsi que des doses élevées d'aracytine dans la phase de consolidation⁴³. Il est à noter qu'à l'inverse des patients âgés, aucune nouvelle drogue n'a été récemment enregistrée dans traitement des LAM du sujet jeune.

En France, 2 protocoles de traitement d'induction sont largement utilisés : le protocole BIG-01 pour les patients âgés de moins de 60 ans, le protocole LAMSA07 pour les patients de plus de 60 ans.

Le protocole BIG-1 est un essai multicentrique (N° EudraCT : 2014-000699-24 PHRC2010-03), impliquant la quasi-totalité des centres d'hématologie français, actuellement en cours de recrutement pour les LAM non CBF. BIG-01 évalue les 3 phases principales du traitement des LAM : l'induction (augmentation des doses de daunorubicine), la consolidation (modulation de doses de cytarabine puis par l'introduction de la vosaroxine) et l'allogreffe de CSH (indication est portée en fonction de la stratification cytogénétique et de la MRD).

Cette étude a également pour objectif de définir de nouvelles classes pronostiques en comparant les résultats de plusieurs schémas de traitements au sein des différents sous-groupes de patients définis notamment selon leur profil mutationnel.

De manière résumée, les patients bénéficient d'une induction standard associant daunorubine et cytarabine. S'en suit une randomisation dans 4 groupes distincts :

- Consolidation par aracytine haute dose (HDAC) 3g/m²/j pendant 3 jours vs. aracytine à doses intermédiaires (IDAC) 1.5 g/m²/j pendant 3 jours.
- Consolidation par HDAC avec dexaméthasone (10mg/12h J1-3-5)
- Consolidation par IDAC et Vosaroxine 10mg/m² J1 + J4

Tous les patients bénéficient d'un traitement par facteurs de croissance granulocytaires (G-CSF 5 µg/kg/jour de J8 jusqu'à la sortie d'aplasie) afin de réduire le risque de complications infectieuses.

Les patients âgés sont traités à l'induction selon le protocole LAM-SA07⁴⁴ qui prévoit une induction par idarabucine et aracytine doses faibles en continu ainsi que des consolidations par idarubicine J1 + Cytarabine J1 à J5 à doses faibles.

i. Traitement des LAM CBF

Les protocoles utilisés dans les LAM dites CBF reposent notamment sur les résultats de l'étude LAM-CBF 2006⁴⁵.

- Moins de 65 ans : Induction selon le protocole BIG-01 avec « schéma 3+7 » bras daunorubicine incluant daunorubicine 90mg/m²/jour, de J1 to J3 (IV, 30min) + cytarabine 200mg/m²/j de J1 à J7 (IV 24 h) ^{36,37} .)
- Plus de 65 ans : Induction selon le protocole LAMSA07 en « schéma 5+7 » avec idarubicine 8mg/ m²/jour pendant 5 jours+ cytarabine 100mg/m²/J de J1 à J7 (IV 24h).

Les protocoles de consolidation sont globalement issus des mêmes protocoles utilisés à l'induction et comprennent :

- Moins de 65 ans, 3 consolidations en fonction de la randomisation du BIG-01.
- Plus de 65 ans, 2 à 3 consolidations de type IDAC à 1.5 g/m²/J pendant 3 jours. A partir de 75 ans pour les LAMCBF et à partir de 70 ans pour les LAM non CBF, ces doses sont réduites à 1 g/m²/J.

ii. Traitement des LAM non CBF

Pour ce qui est des patients atteints d'une LAM non CBF :

- Moins de 61 ans : traitement selon BIG-01 (identique aux CBF de moins de 65 ans)
- De 61 à 65 ans et classification ELN favorable ou intermédiaire : Induction selon BIG-01 bras idarubicine suivi de 3 consolidations IDAC

- Plus de 65 ans, la stratégie de consolidation peut varier en fonction du statut NPM1 et CEBPA (doses intermédiaires ou faibles d'aracytine).

Pour les patients présentant une classification ELN défavorable, 2 stratégies peuvent se discuter :

- Induction par daunorubicine-aracytine liposomale 44 mg/m² J1, J3, J5, suivie d'une consolidation (CPX 29 mg/m² J1, J3) suivie ou non d'une greffe.

- Induction classique avec pour les patients âgés de 61 à 65 ans induction selon BIG-01 suivie d'une consolidation IDAC. Pour les patients âgés de plus de 65 ans une induction selon LAMSA07 suivie d'une consolidation 1+5. Pour ces 2 tranches d'âge, une greffe peut être envisagée au terme de la consolidation 1.

3. Chimiothérapie intrathécale

La réalisation d'une chimiothérapie intrathécale est indiquée en cas d'atteinte suspectée ou confirmée du SNC. Le schéma d'administration comprend 2 PL triples par semaine jusqu'à disparition des blastes ou des signes cliniques. 6 PL au total doivent être réalisées, une irradiation cérébrale (24Gy) vient compléter les PL, soit à la fin des consolidations, soit avant la greffe. La chimiothérapie intrathécale est également indiquée en prophylaxie en cas d'hyperleucocytose (> 100G/L, BIG-01), ou en cas de LAM5. Il est à noter que la première PL IT doit être réalisée seulement après disparition de la blastose sanguine en raison du risque de dissémination méningée lors du geste.

4. Prise en charge non intensive

Pour les patients non éligibles à une chimiothérapie intensive, une inclusion dans un essai clinique, un traitement aracytine à faibles doses ou par 5-azacytidine (Vidaza) peut être proposé. Une chimiothérapie à visée palliative de type purinéthol/méthotrexate ou hydroxycarbamide peut être à considérer en cas d'âge élevé et/ou de comorbidités importantes.

5. Allogreffe de CSH

Les patients atteints de LAM considérés comme étant les plus à risque de rechute peuvent bénéficier d'une allogreffe de CSH en première rémission complète (RC1). Une allogreffe de CSH est réalisée s'il existe une maladie résiduelle (diminution < 3 log ou <4 log si NMPM1 muté), si une première chimiothérapie d'induction n'a pas permis l'obtention d'une RC, en cas de classification ELN défavorable, intermédiaire ou de LAM secondaires. Mais la réalisation d'une allogreffe dépend également des comorbidités (HCT-CI) et de la disponibilité d'un greffon.

6. Autres traitements

Il est intéressant de noter que le panel thérapeutique très restreint dans la LAM s'est développé depuis 2 ans avec l'AMM de 2 nouvelles drogues, introduites après la fin de notre étude : il s'agit de la midaustaurin, un inhibiteur de tyrosines kinases multicibles qui adjoint au traitement standard des LAM FLT3 muté a montré un bénéfice en termes de survie globale et de survie sans événements 46 Depuis peu, quel que soit l'âge ou le statut CBF ou non, les LAM qui sont mutés pour FLT3 bénéficient d'un traitement supplémentaire par MIDOSTAURIN 100mg/jour (2 prises per os) administré pendant l'induction et les consolidations (Haute Autorité de Santé - RYDAPT (midostaurine), inhibiteur de tyrosine kinase [Internet]. [cited 2019 Apr 23]. Available from: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2862069/fr/rydapt-midostaurine-inhibiteur-de-tyrosine-kinase).

De plus les patients de 60 à 75 ans présentant une LAM non CBF secondaires (AML-MRC ou tAML) et éligibles à une chimiothérapie d'induction peuvent, dans le cadre de l'AMM de juin 2018, être traités par CPX-351 (Vyxeos), qui correspond à une formulation liposomale associant la daunorubine à de la cytarabine. Cette nouvelle drogue permet une réduction substantielle de la mortalité précoce chez les patients âgés par rapport à une chimiothérapie « 3+7 »⁴⁷.

L'adjonction de ces nouvelles thérapies complexifie la décision thérapeutique. L'indication de la midostaurin ou du CPX-351 ne sont exclusives, ainsi une

proportion non négligeable de patients peut être éligible pour les 2 traitements à la fois (Figure 5, ⁴⁸) s'il présente une LAM FLT3 muté et secondaire à un antécédent hématologique. L'indication d'un traitement plutôt qu'un autre est pour le moment laissée à l'appréciation du clinicien puisqu'il n'existe pas d'étude ayant évalué ces 2 thérapies en combinaison.

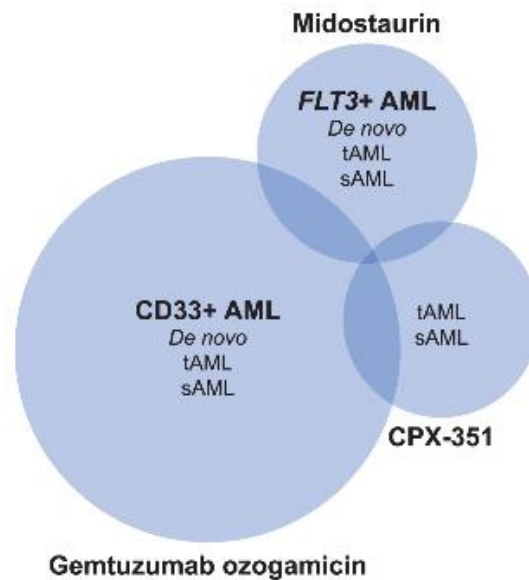


Figure 3 : Aires de chevauchements thérapeutiques possibles des nouveaux agents indiqués en traitement de 1^{ère} ligne d'une LAM. D'après Talati et al. (48)

III. Pronostic de la LAM

D'après les registres américains et suédois, la survie des LAM est en constante augmentation depuis les 40 dernières décennies. Les analyses du registre SEER mettent en évidence des taux relatifs de survie à 5 ans variant de 6.2% dans la période de 1975 à 1977 contre 23.6% sur la période de 2000 à 2007⁴⁹.

L'amélioration de la survie est d'autant plus marquée pour les patients jeunes, comme l'indique l'analyse du registre suédois portant sur 9729 patients atteints de LAM entre 1973 et 2006⁵⁰.

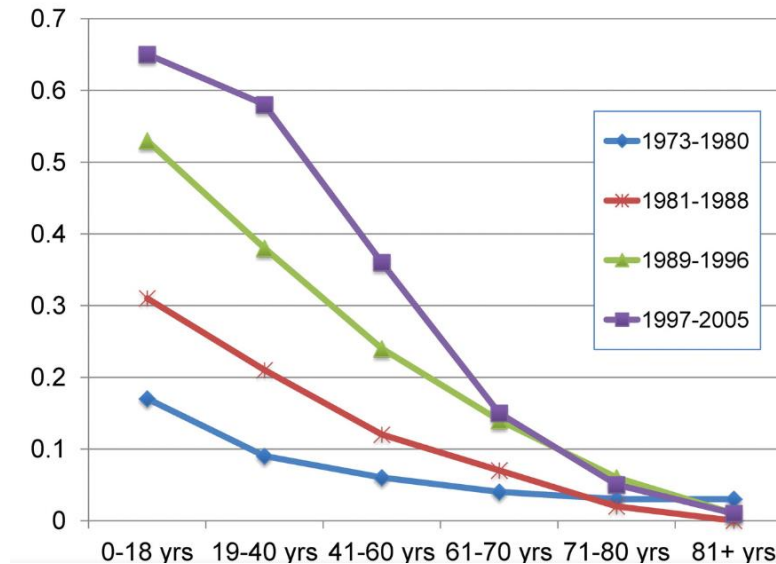


Figure 4: Projection des survies relatives à 5 ans des patients atteints de LAM en fonction de la période et de l'âge. D'après Juliusson et al. (65) la base de l'étude de Derolf et al.

Plus récemment, la SG à 5 ans des patients atteints d'une LAM diagnostiquée entre 2009 et 2015 est évaluée à 28,3%. En dépit des progrès thérapeutiques et d'une meilleure compréhension de la biologie de la LAM, le pronostic des patients reste très péjoratif. La survie des patients atteints de LAM est liée à des facteurs pronostiques comprenant des facteurs liés à la TRM et liés à la résistance au traitement. Ces facteurs peuvent être reliés au patient ou à la maladie. Leur hétérogénéité aboutit à une stratification du risque spécifique pour chaque patient et conditionnent notamment le traitement de post-rémission pouvant comporter notamment une procédure d'allogreffe.

1. Facteurs pronostiques liés à la maladie

a. Facteurs génétiques

Il existe certaines anomalies communes dans la LAM, comprenant les anomalies cytogénétiques comme la t(1 ;17), la t(8 ;21), l'inversion du 16 ou la délétion des chromosomes 5 et 7 . Chez certains patients, des translocations chromosomiques sont associées au réarrangement de proto-oncogènes entraînant la production d'un transcrite de fusion, le plus souvent un facteur de transcription intervenant dans des processus de prolifération ou différenciation cellulaire, comme le récepteur à l'acide rétinoïque (RAR), le core binding factor (CBF), ou le gène MLL. Il existe d'autres mutations impliquant notamment les gènes NPM1, CEPBA, FLT3, cKIT, N-RAS, GATA-1, MYC, p53, WT1, WNT.

Les anomalies génétiques qui sont considérées comme des facteurs de résistance au traitement comprennent à la fois les altérations cytogénétiques et le statut mutationnel. Ces données sont prises en compte dans la classification ELN 2017 permettant de définir précisément les classes pronostiques des patients (Tableau 3). Cette classification est unanimement utilisée afin de stratifier le risque des patients atteints de LAM en fonction du risque cytogénétique et moléculaire. En comparaison de sa version antérieure datant de 2010, la classification ELN 2017 fait appel à de nouveaux marqueurs pronostiques recherchés maintenant au diagnostic d'une nouvelle LAM, il s'agit la recherche des mutations ASXL1⁵¹ RUNX1⁵² et TP53⁵³. Elle intègre également la pris en compte du caractère défavorable d'un caryotype monosomal et prend en compte le ratio FLT3-ITD muté.

Etant donné le faible recul, il existe peu d'études évaluant la version 2017 de la classification ELN donc il est difficile de trouver les proportions exactes de patients dans chaque catégorie. Selon une étude japonaise, à l'exception du seuil utilisé pour la mutation de FLT3, la classification ELN 2017 par rapport à sa version antérieure de 2010, permettait de déterminer 3 groupes de rémission et de survie distincts chez 197 patients ⁵⁴. Selon cette étude comportant 90% de patients de moins de 60 ans, la proportion de patients dans la catégorie ELN favorable était de 54.8%, contre 21.8% de patients dans la catégorie intermédiaire et 23.4% de patients dans la catégorie défavorable. La classification ELN 2017 a également permis une distinction

pronostique dans une étude rétrospective de patients âgés de moins de 60 ans traités par induction, avec dans les catégories favorable, intermédiaire et défavorable 27%, 46% et 27% de patients respectivement. La survie globale à 5 ans des patients dans cette étude était respectivement de 57%, 37%, et 18%⁵⁵. Les différences de survie retrouvées dans cette étude, en fonction des classifications ELN 2010 et 2017 sont illustrées dans la figure 7.

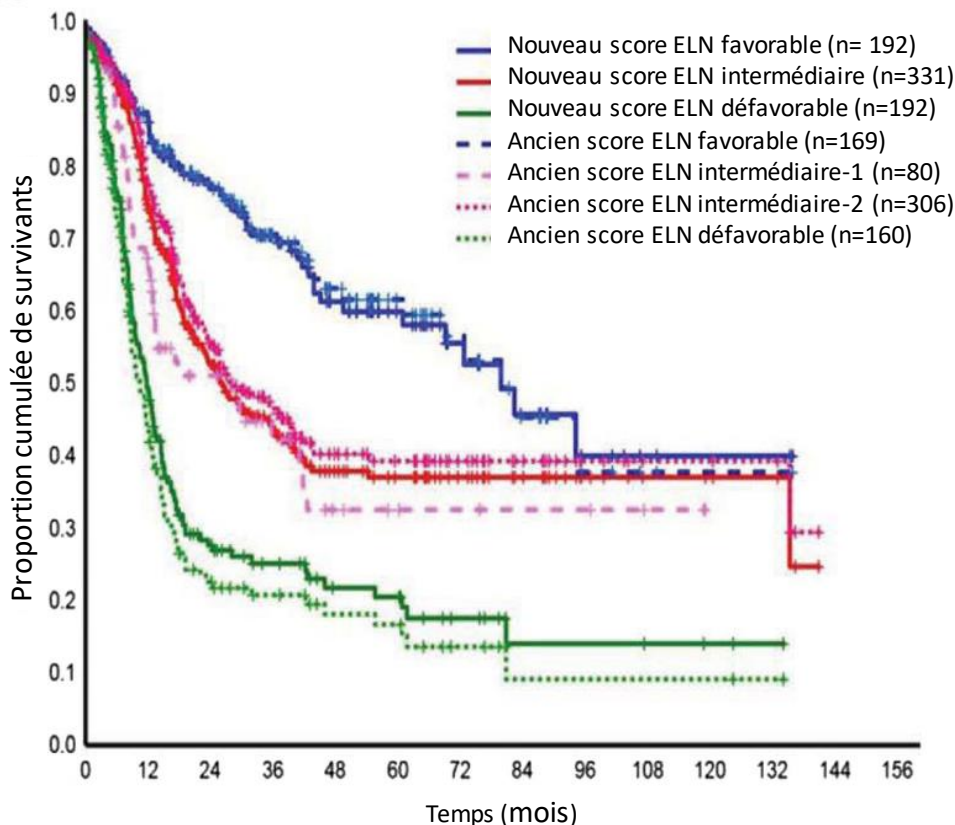


Figure 5: Survie globale en fonction des classifications ELN 2017 et 2010. Résultats obtenus sur 590 patients, sans prise en compte de la réalisation d'une allogreffe de CSH. D'après Boddu et al.

i. Risque cytogénétique

Il a été montré que le caryotype est le facteur pronostique le plus important à la fois pour prédire le taux de rémission, de rechute et de survie⁵⁶.

Les anomalies du caryotype qui sont incluent dans la classification ELN 2017 comprennent :

- Pour les LAM de pronostic favorable : t(8;21), inv(16) ou t(16;16)
- Pour les LAM de pronostic intermédiaire : caryotype normal, t(9 ;11), anomalies cytogénétiques non classifiées comme favorable ou défavorable.
- Pour les LAM de pronostic défavorable : t (9 ;22), inv(3)/t(3 ;3), -7, -5 ou del(5q)-17/abn(17p), t(6;9), t(v ;11q23.3), ainsi qu'un caryotype complexe ou monosomal.

La t(15 ;17) définit la LAM3 dont le pronostic a été considérablement amélioré depuis l'introduction de l'ATRA. La survie globale de ces patients est de 80-90% selon les études ⁵⁷, ce qui fait de ce sous-type de LAM une entité à part entière au regard des autres sous-types de LAM.

La classification ELN prend également en compte le profil mutationnel des blastes myéloïdes.

ii. Statut mutationnel

Mutations de NPM1 (30%)

Le gène NPM1 code pour la nucléophosmine, une phosphoprotéine nucléolaire impliquée dans plusieurs processus biologiques tels que le maintien de la stabilité du génome, la réparation de l'ADN, le chaperoning des histones, la biogénèse des ribosomes. Elle intervient également dans la régulation de gènes suppresseurs de tumeurs tels que p53 ⁵⁸, MDM2 ⁵⁹ ou ARF ⁶⁰. La mutation de NPM1 dans l'exon 12 entraîne une délocalisation cytoplasmique de la nucléophosmine.

On considère qu'environ 1/3 des LAM ⁶¹ et environ 50% des patients avec caryotype normal présentent un NPM1 muté.

Sur le plan pronostique, une mutation isolée de NPM1 confère un pronostic comparable à celui des LAM avec t(8;21) ou avec anomalie du chromosome 16p. En comparaison aux LAM à caryotype normal avec NPM1 sauvage, les LAM à caryotype normal mais présentant une mutation de NPM1 ont des meilleurs taux de RC, de SSE et une SG ⁶².

Mutations de CEBPA (10%)

Le gène CEBPA code pour un facteur de transcription qui intervient dans le contrôle de la prolifération et la différenciation des progéniteurs myéloïdes.

La perte de l'expression de CEBPA peut être liée à des mutations, à des modifications post transcriptionnelles ou épigénétiques ou encore à des interactions avec des protéines de fusion (RUNX1-RUNX1T1 ou CBFβ-MYH11).

Les mutations directes du gène sont bialléliques dans 65% des cas, et ce sont les seules qui sont considérées comme ayant un impact pronostique ⁶³. Elles concernent 7 à 11% de l'ensemble des LAM. L'impact pronostique d'une mutation biallélique est favorable tant sur le plan des taux de RC que de survie⁶⁴. Il est à noter que la présence associée d'une mutation FLT3-ITD (30% des cas), ou de DNMT3A fait perdre le bénéfice pronostique ⁶⁵.

Mutations de FLT3 (20% -ITD)

Le gène FLT3 code pour un récepteur à activité tyrosine kinase impliqué dans l'hématopoïèse. 2 classes de mutations distinctes ont été identifiées dans ce gène, elles concernent soit les duplications en tandem (mutation FLT3 ITD) présentes chez 20 à 30% des patients, soit les mutations touchant le domaine tyrosine kinase (mutation FLT3 TKD) ⁶⁶ qui concerne 10% des patients.

La mutation ITD peut se retrouver au sein de tous les types FAB, elle est plus fréquente en cas de LAM3 et dans la LAM avec t(6 ;9). La mutation FLT3 –ITD est associée à un mauvais pronostic avec une survie médiane dans les LAM à caryotype normal, de 6 à 12 mois en fonction des études ⁶⁷, néanmoins son impact pronostique peut varier en fonction de la présence associée ou non de mutations de NPM1 ou de CEBPA.

Mutations d'ASXL1 (5-15%)

Elles sont associées à l'âge, aux mutations associées aux CHIP, ou aux AML secondaires à un antécédent hématologique ⁶⁸. Elles ont un impact pronostique délétère. ⁶⁹

Mutations de TP53 (12%)

Elles sont plus fréquemment associées à un caryotype complexe ou monosomale, aux LAM secondaires à un antécédent hématologique ou aux tAML. Elles sont un facteur de mauvais pronostic ⁷⁰.

Mutations de RUNX1 (5-20%)

Elles sont associées à l'âge, aux LAM secondaires à un antécédent hématologique et tAML. Elles sont associées à des taux plus faibles de CR 71 et de SG. ⁷²

D'autres mutations non considérées dans la classification ELN 2017 pourraient également être prises en compte ⁷³ parmi elles les mutations c-kit et IDH 1 et 2, peuvent être ciblées par un traitement. Les mutations de c-kit a montré avoir un impact pronostique délétère dans les LAM CBF. La stratification pronostique des LAM pourrait également bientôt reposer sur d'autres mutations impliquant notamment TET2 ⁷⁴, DNMT3 ⁷⁵, RAS, BRAF ⁷⁶, GATA2 ⁷⁷, ATM ⁷⁸ et WT1 .

En intégrant d'autres altérations génétiques, Papaemmanuil et al. ont montré l'existence de nombreuses mutations à considérer comme drivers, et qui pourraient constituer des marqueurs utiles à la stratification pronostique des patients, mais aussi au traitement des LAM en définissant des marqueurs « actionnables » c'est-à-dire pouvant être spécifiquement ciblés par un traitement, qu'il s'agisse de chimiothérapies ou de nouvelles molécules à l'essai.

Lorsque l'on considère la population âgée, la classification ELN 2017 serait également perfectible. En effet, la majorité des études ayant permis d'aboutir à la conception de cette classification étaient conduites sur des individus jeunes. Une étude NGS menée sur 397 patients atteints de LAM de novo de plus de 60 ans et traités selon les protocoles Alliance, mettait en évidence des caractéristiques cytogénétiques et mutationnelles distinctes dans la population âgée, permettant de proposer une nouvelle classification pronostique dans cette catégorie de patients. En tenant compte des résultats des modèles univariés et multivariés, et des mutations associées aux LAM NPM1 mutés, les auteurs ont montré qu'il existait 3 patterns pronostiques différents, associés à un différentiel en termes de RC, de SSL et de SG ⁷⁹. Comme illustré par les figures 7A et B, il existe une meilleure discrimination pronostique en termes de survie globale entre les groupes favorable, intermédiaire et défavorable en utilisant la stratification génétique proposée. La survie globale à 3 ans des groupes favorable, intermédiaire et défavorable étaient respectivement de 30%, 12% et 6% en prenant en compte la classification ELN 2017 contre 45%, 18% et 4%

dans la stratification génétique proposée.

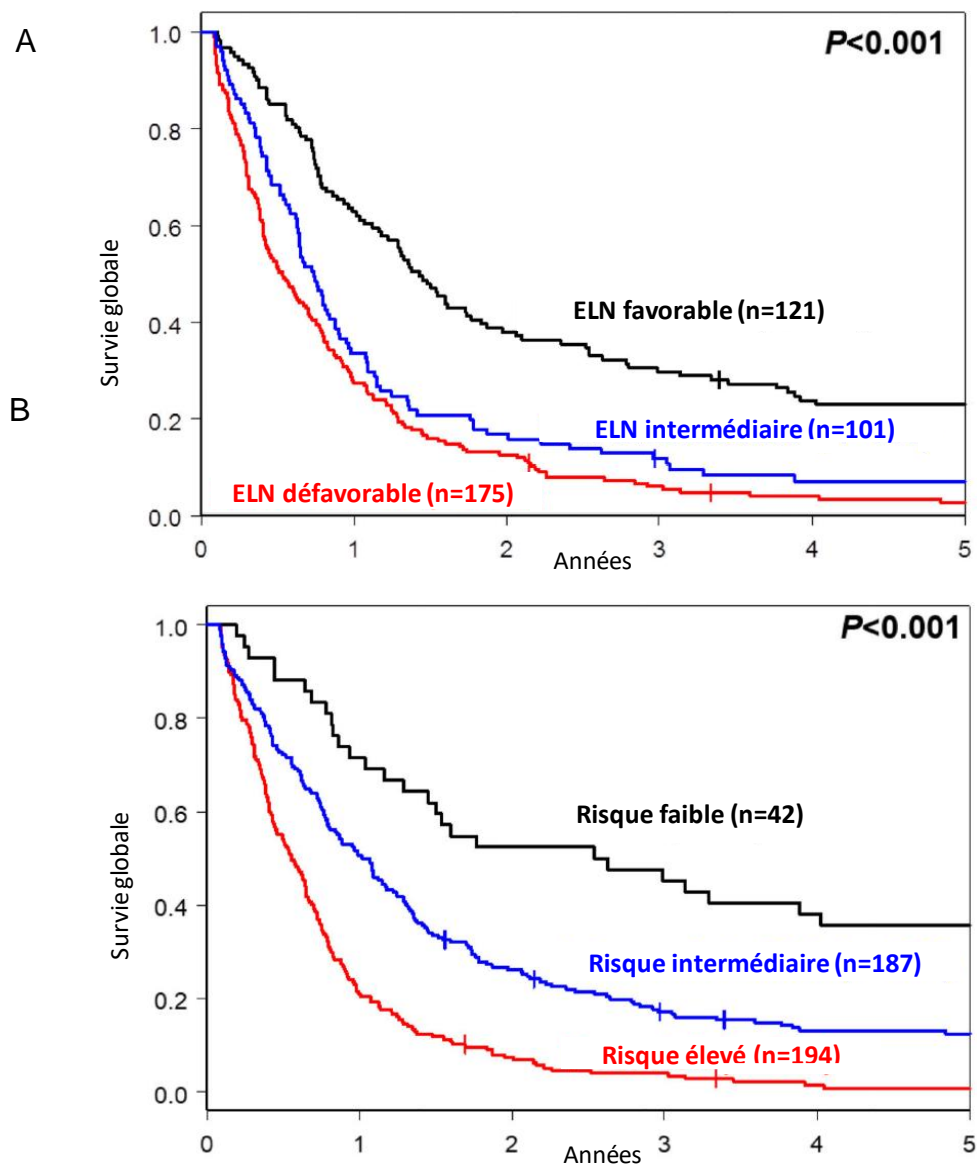


Figure 6: Survie globale chez des patients atteints de LAM âgés de plus de 60 ans, d'après Eisfeld et al.

A Selon la classification ELN 2017

B Selon la classification ELN modifiée

altérations génétiques considérées actuellement comme les plus pertinentes en terme pronostique sont susceptibles d'évoluer sous l'effet de nouveaux protocoles et molécules utilisés dans la LAM.

La thérapie personnalisée a récemment fait son entrée dans le domaine de la LAM, elle repose sur la recherche de traitements qui ciblent des mutations et/ou des altérations de voies de signalisation, qui sont propres à chaque LAM, leur conférant une chimiosensibilité unique. De nouvelles approches combinant un screening de drogues à des analyses génomiques obtenues en NGS ont été récemment mises en œuvre ⁸⁰.

b. Modifications épigénétiques

Les modifications épigénétiques rencontrées fréquemment dans la LAM ont montré être associées à un impact sur la survie. L'hyperméthylation d'autres gènes comme CDKN2B, PRDX2, GSTM1 ou E-cadhérine sont associés à un mauvais pronostic ⁸¹. A l'inverse, l'hyperméthylation du récepteur à l'oestrogène⁸² et du gène CEBPA⁸³ semblent associées à une meilleure survie.

La dérégulation de l'état de méthylation de l'histone 3 lysine 9 triméthylée (H3K9me3) a montré être associée indépendamment à l'SSE⁸⁴.

De manière globale, l'hyperméthylation de gènes du complexe Polycomb ⁸⁵ ou de gènes promoteurs ⁸⁶ (semblent avoir un effet indépendant sur d'autres facteurs pronostiques).

2. LAM secondaires

Les LAM secondaires à des traitements, ou secondaires à un SMD ou à un SMP représentent 25 à 35% de l'ensemble des LAM. Elles sont associées à un moins bon pronostic : des taux de rémissions, de SSP et de SG inférieurs aux LAM de novo. Plusieurs facteurs rentrent en ligne de compte : âge des patients plus élevé, possibles séquelles du traitement, fréquence accrue des anomalies cytogénétiques et moléculaires de pronostic défavorable (anomalies de la voie p53, monosomie du 5 ou du 7, caryotype complexe).

Les taux de mortalité précoce des LAM secondaires sont supérieurs à ceux des LAM de novo⁸⁷ La qualité de vie et le ressenti des patients atteints d'une LAM secondaire est également moins bonne⁸⁸ .

L'impact pronostique des tAML et des LAM secondaire à un antécédent hématologique est cependant à nuancer, car parmi les patients âgés de plus de 60 ans et les patients présentant un caryotype défavorable, le fait de présenter une LAM secondaire à un traitement ou à un antécédent hématologique (hors LMMC et SMP) ne modifierait pas le pronostic.

a. LAM secondaires à un antécédent hématologique

Il a été suggéré que les LAM secondaires à des SMP ont une moins bonne survie que les patients présentant un SMD en raison d'une instabilité génétique accrue⁸⁹ .

En considérant les LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies, les taux de SG sont inférieurs aux patients présentant une LAM-NOS, indépendamment de l'âge et du risque cytogénétique⁹⁰ Une large cohorte prospective de patients chinois retrouve des taux de RC similaires entre les LAM-MRC et les LAM NOS, mais une survie médiane significativement différente, respectivement de 10 et 12 mois .

L'impact pronostique délétère des AML-MRC semble être lié avant tout aux anomalies cytogénétiques plus défavorables. Une étude portant sur 104 patients âgés de moins de 66 ans présentant un pronostic ELN intermédiaire et traités par induction met en évidence un pronostic similaire des LAM-MRC par rapport aux LAM-NOS⁹¹ Une étude des registres danois portant sur 3300 patients atteints de LAM montre que les patients ayant une LAM secondaire, contrairement aux patients présentant une tAML, bénéficient moins fréquemment d'un traitement intensif.

b. LAM secondaires à un traitement

Les tAML ont un plus mauvais pronostic que les LAM de novo. Après une stratification sur l'âge, une étude multicentrique prospective retrouve des survie globale à 4 ans de 25.5% (95%-CI 19.6%-33.1%) contre 37.9% (95%-CI 36.0%-40.0%; p = .001) chez les patients atteints d'une LAM de novo⁹².

L'impact pronostic délétère du caractère secondaire semble être indépendant de la cytogénétique, puisque parmi les patients présentant une cytogénétique favorable, les tAML ont un moins bon pronostic. Il a été notamment retrouvé que les

patients atteints d'une LAM CBF secondaire à un traitement ont une moins bonne survie que les patients atteints d'une LAM de novo ⁹³ .

L'âge semble influencer sur le pronostic et la TRM des tAML. D'après l'étude de Kayser et al. chez les patients jeunes traités intensivement, une tAML avait un effet délétère sur la SG, et était un facteur de risque de décès en RC, il n'était en revanche pas associé à plus de rechutes. Il est possible que dans cette population jeune, l'effet toxique cumulatif des chimiothérapies administrées contribuait à des taux élevés de décès en RC. A l'inverse, dans la population âgée, une tAML augmentait seulement le risque de rechute mais n'influaient pas sur les décès en RC ou la SG. Il n'existait cependant pas de différence en termes de réponse à l'induction et ce, quel que soit l'âge. Ces résultats laissant suggérer qu'un traitement de post-rémission plus intensif pourrait être à considérer dans les tAML.

3. Microenvironnement leucémique

Le microenvironnement tumoral (moelle et/ou organes infiltrés par les blastes) dans les LAM est constitué de différents types cellulaires jouant un rôle dans le développement, la prolifération et la survie des blastes. Le microenvironnement tumoral a été particulièrement étudié dans les cancers solides, et fait l'objet de récentes publications dans la LAM. A l'instar des multiples variables génétiques, il apparaît qu'il existe également une hétérogénéité du microenvironnement leucémique en fonction de chaque patient.

Le concept de microenvironnement tumoral se réfère également à la résistance à la chimiothérapie⁹⁴, qui peut être acquise ou « de novo ». Dans le premier cas, il s'agit d'une variation génétique qui favorise la survie des blastes de LAM qui acquièrent un phénotype résistant, dans le 2nd cas le microenvironnement engendre dès le départ une résistance à l'apoptose.

Les facteurs pronostiques discutés dans cette partie ne font pas encore l'objet de recommandations internationales.

a. Cellules souches leucémiques

Les cellules tumorales initiatrices ou cellules souches tumorales sont considérées comme étant indispensables au développement de cancers ou

d'hémopathies malignes. C'est dans la LAM que ce concept a été pour la première fois décrit⁹⁵. Ces cellules souches leucémiques (CSL) sont définies et distinctes des cellules souches hématopoïétiques normales par leur immunophénotype, Plusieurs études ont retrouvé qu'un nombre élevé de CSL au diagnostic étaient associés à une moins bonne survie ⁹⁶ .

4. Autres potentiels biomarqueurs

L'ostéopontine est une glycophosphoprotéine, qui a montré un rôle dans la modulation de l'immunité innée au cours de processus inflammatoire ou de réparation cellulaire. Son impact pronostique a été décrit dans plusieurs sous-types de cancers. D'après la méta-analyse de Chen et al. ⁹⁷, son expression est inversement corrélée à la survie des patients et pourrait servir de cible thérapeutique.

La résistance à la chimiothérapie peut faire intervenir des facteurs d'adhésion, comme le récepteur CXCR4 qui contrôle la migration et le homing. Sa surexpression a également été associée à un impact péjoratif sur la survie ⁹⁸ .

PARTIE II Modulation red/ox au profit de la guérison :

Introduction :

Les mitochondries sont des organites multifonctionnels qui régulent des processus pivots contrôlant l'homéostasie cellulaire. Leurs fonctions complexes et diversifiées comprennent l'équilibre entre le métabolisme bioénergétique et le métabolisme cellulaire, les programmes de mort cellulaire. Dans des conditions physiologiques, les mitochondries sont la principale source de production de ROS. Ces fractions réactives de l'oxygène agissent comme des seconds messagers et en cas de surproduction provoquent un état de stress oxydatif, associés à de nombreuses pathologies ^{99,100}. Les ROS sont générés par la chaîne respiratoire lors de la phosphorylation oxydative sous forme d'anion superoxyde (O_2^-) et sont immédiatement transformée par la superoxyde dismutase mitochondriale (MnSOD) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ¹⁰¹. Les ROS mitochondriaux causent des dommages oxydatifs aux membranes mitochondriales, aux protéines et à l'ADN, qui altèrent la capacité de la mitochondrie à synthétiser l'ATP et ainsi de remplir ses fonctions métaboliques. L'oxydation mitochondriale peut endommager la membrane externe mitochondriale et activer l'apoptose. Le signal redox généré n'influence pas seulement les mitochondries, mais aussi une vaste gamme de processus cytosoliques et nucléaires entraînant des changements dans le comportement et le destin des cellules. Le stress oxydatif ne modifie pas seulement les voies de signalisation dans la cellule, mais peut aussi influencer la génétique et l'épigénétique, des changements modulant ainsi la prolifération et la différenciation cellulaires ¹⁰². Les cellules souches présentent un intérêt particulier, notamment dans les domaines suivants dont il a été démontré que les ROS régulent l'auto-renouvellement des cellules souches, la différenciation et l'apoptose. Les ROS peuvent influencer des changements dans l'expression des gènes à la fois directement, en altérant la fonction de nombreux facteurs de transcription, ou indirectement par la modification des éléments de régulation épigénétique.

I. Les VOIES RED/OX DANS LA LAM :

1. Base scientifique :

a. Reprogrammation métabolique mitochondriale :

L'implication des mitochondries dans l'étiologie des maladies néoplasiques a été suggérée depuis les années 1930, lorsque le médecin et scientifique allemand Otto Heinrich Warburg, lauréat du prix Nobel « effet Warburg », a découvert que les mitochondries dans les cellules cancéreuses ne généraient pas efficacement de l'énergie ¹⁰³. Contrairement aux maladies neurodégénératives et induites par l'ischémie, le dysfonctionnement mitochondrial des cellules tumorales a tendance à conduire à la survie des cellules et à la résistance à la chimiothérapie ¹⁰⁴. Contrairement à la stratégie thérapeutique pour les maladies neurodégénératives et ischémiques, qui est la prévention de la mort cellulaire, le principal objectif du ciblage de la mitochondrie dans les cancers, est d'induire l'apoptose dans les cellules malignes ¹⁰⁵. De plus en plus d'éléments suggèrent que les cellules tumorales présentent un niveau de ROS intrinsèque accru, en partie dû à la stimulation oncogénique, à une activité métabolique accrue et à un dysfonctionnement mitochondrial ¹⁰⁶. Malgré leur variabilité, presque toutes les cellules néoplasiques ont une utilisation accrue du glucose pour la glycolyse aérobie afin de générer de l'ATP. Les cellules tumorales les plus glycolytiques se sont avérées les plus résistantes au traitement et les plus agressives ¹⁰⁷.

Comme indiqué précédemment, les cellules tumorales adoptent ce phénotype pour leur survie. La liaison du Voltage dependant anion channel (VDAC) empêche les protéines Bad et Bax de se lier à la membrane mitochondriale externe, et aident donc à immortaliser ces cellules ¹⁰⁸. Les cellules tumorales sont également mieux à même de résister à un microenvironnement défavorable (hypoxie, acidose et pénurie de facteurs de croissance) en raison de leur adaptation métabolique. Considérant le rôle clé des mitochondries dans la mort cellulaire, il apparaît que le «silence» mitochondrial relatif dans les cellules néoplasiques peut, du moins en partie, expliquer la résistance de certaines tumeurs au traitement. Les mitochondries des cellules cancéreuses (par exemple Hela et les carcinomes pulmonaires non à petites cellules) sont plus résistantes à la perméabilité de la membrane mitochondriale

externe en raison de la surexpression de la famille de protéines Bcl^{109,110}. Il est connu que les cellules tumorales s'adaptent à l'hypoxie en induisant la transcription de multiples gènes via l'activation du facteur de transcription HIF-1a. Les protéines induites par HIF-1a sont impliquées dans la régulation du métabolisme glycolytique ainsi que dans la croissance tumorale et l'angiogénèse. Il est proposé que les ROS, en particulier H₂O₂, produit à partir du complexe III soit un intermédiaire probable pour l'initiation et la stabilisation de HIF-1a pendant l'hypoxie¹¹¹. Par conséquent, une meilleure compréhension du fonctionnement des mitochondries pour déclencher une réponse hypoxique conduira à la mise au point de traitements ciblant la consommation d'oxygène, la production de ROS ou la modification des concentrations de métabolites clés dans les mitochondries¹¹².

b. Les ROS dans tout leur état :

i. Effet seuil :

De faibles niveaux de production de ROS peuvent stimuler la tumeur la croissance, accompagnée d'une production adaptative d'antioxydants. Les niveaux faibles de ROS, en stimulant la production d'antioxydants, peuvent contribuer également au développement de résistances acquises aux traitements. Comme le niveau de ROS dans la cellule augmente, le rapport ROS/antioxydant atteint un point tel que la capacité destructrice de la ROS prend le pas sur l'effet protecteur des antioxydants. Au-delà de ce point, de nouvelles augmentations des ROS ou de réduction de l'activité antioxydante entraînera un déséquilibre dans les cellules tumorales conduisant à la mort cellulaire ou à l'apparition d'une sensibilité accrue des cellules tumorales à d'autres substances cytotoxiques¹¹³.

Les antioxydants protègent non seulement les cellules normales, mais aussi les cellules anormales. Un déséquilibre dans le système antioxydant peut entraîner l'incapacité de la cellule à faire face aux stress exogènes. Dans les cellules normales, le piégeage des radicaux libres par l'utilisation d'antioxydants est un moyen efficace d'éliminer les radicaux libres. Pour une tumeur en place, la formation d'antioxydants semble profiter à la tumeur et améliorer la résistance de ces cellules à la chimiothérapie. Par conséquent, l'augmentation de la production de ROS et/ou la

diminution de la capacité antioxydante de l'organisme par l'utilisation d'inhibiteurs antioxydants peuvent être souhaitable ¹¹⁴. Cette stratégie, qui rompt l'équilibre à l'intérieur des cellules tumorales, est supposé être une technique efficace pour le traitement des tumeurs malignes.

ii. Peroxydation lipidique :

Il est reconnu depuis longtemps que des taux élevés de radicaux libres ou d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) peut infliger des dommages directs aux lipides. Les deux ROS les plus répandues pouvant affecter profondément les lipides sont principalement des radicaux hydroxyles (HO) et hydroperoxyde (HO₂). Le radical hydroxyle (HO) est petit, très mobiles, solubles dans l'eau et chimiquement le plus réactif. Cette molécule de courte durée de vie peut être produit à partir de l' O₂ dans le métabolisme cellulaire. La cellule produit environ 50 radicaux hydroxylé chaque seconde. En une journée, chaque cellule générerait 4 millions de radicaux hydroxyles pouvant être neutralisés ¹¹⁵. Les radicaux hydroxyles causent des dommages oxydatifs aux cellules ¹¹⁶ situé à moins de quelques nanomètres de son site de génération et sont impliqués dans la neurodégénérescence ¹¹⁷, les maladies cardiovasculaires ¹¹⁸ et le cancer ¹¹⁹. Il est généralement admis que HO dans les systèmes biologiques est formé dans le cycle redox par la réaction de Fenton, où le fer libre (Fe²⁺) réagit avec le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et la réaction de Haber-Weiss aboutit à la production de Fe²⁺ lorsque le superoxyde réagit avec du fer ferrique (Fe³⁺). D'autres métaux de transition, y compris Cu, Ni, Co et V peuvent être responsable de la formation de HO dans les cellules vivantes. Le radical hydroperoxyde (HO₂) joue un rôle important dans la chimie de la peroxydation lipidique. Il peut réagir avec des métaux, y compris le fer ou le cuivre, pour générer du HO· à travers les réactions de Fenton ou Haber-Weiss. Le HO₂ est un oxydant beaucoup plus puissant que le radical superoxyde anionique et pourrait initier l'oxydation de la chaîne polyinsaturés des phospholipides, entraînant ainsi une altération de la membrane^{120,121}.

De nombreux aldéhydes différents qui peuvent être formés au cours de la peroxydation lipidique, malondialdéhyde (MDA), propanal, hexanal et 4-hydroxynonanal (4-HNE) ont été abondamment étudiés^{122, 123, 124, 125, 126}. Le MDA

semble être le plus mutagène de la peroxydation lipidique, alors que le 4-HNE est le plus toxique ¹²⁷. 4-Hydroxyalcénals produits au cours de la peroxydation des lipides de la biomembrane, provoquée soit par les radicaux libres, soit par les produits chimiques, pourraient exercer un effet génotoxique chez l'homme ¹²⁸. Le 4-HNE, agit à la fois comme molécules de signalisation et en tant que produits cytotoxiques de la peroxydation lipidique causant des effets biologiques à long terme, notamment par la modification covalente de macromolécules. Le 4-HNE est considéré comme l'un des plus actifs physiologiquement, un des principaux générateurs de stress oxydatif.¹²⁹ Ainsi, il n'est pas surprenant que le 4-HNE soit de nos jours considéré comme marqueur de la peroxydation lipidique et une molécule de signalisation impliquée dans la régulation de plusieurs facteurs de transcription sensibles au stress tels que Nrf2, protéine activatrice 1 (AP-1), NF-κB, et les PPAR, la prolifération et/ou différenciation cellulaire, l'autophagie, la sénescence, l'apoptose et la nécrose. Les adduits de MDA sont biologiquement important car ils peuvent participer à des activités délétères secondaires des réactions (par exemple, la réticulation) en favorisant la formation de pont inter et intra moléculaire au sein de l'ADN pouvant induire une altération profonde des propriétés biochimiques. Elles s'accumulent au cours du vieillissement et des maladies chroniques^{130, 131, 132, 133}. Les protéines importantes qui peuvent être modifiés par les adduits de MDA sont les suivants: (i) eEF2 catalyse le déplacement du ribosome le long de l'ARNm durant la synthèse des protéines. Les adduits de MDA avec eEF2 pourrait contribuer au déclin de la synthèse protéique; (ii) le facteur H (FH) est le principal régulateur de la voie alterne dans le plasma qui contrôle étroitement l'activation du complément pour prévenir les attaques contre les cellules hôtes.

L'objectif principal est de métaboliser rapidement les 4-HNE dans les cellules de mammifères pour protéger les protéines des produits de la peroxydation¹³⁴ lipidique. Les voies biochimiques du 4-HNE qui mènent à la formation de métabolites correspondant : alcool 1,4-dihydroxy-2-nonène (DHN), l'acide correspondant Acide 4-hydroxy-2-nonénoïque (HNA) et HNE-glutathion peuvent être résumés en fonction du niveaux de stress oxydatif: (i) en cas de stress physiologique ou de faible niveau de stress, les principales étape de détoxification du 4-HNE est la conjugaison avec GSH pour obtenir glutathionyl-HNE (GS-HNE) ou glutathionyl-lactone (GS- lactone) (forme

ester cyclique 4-HNE-) suivie de NADH-dépendante catalyse la réduction par l'alcool déshydrogénase (ADH-) en glutathionyl-DNH (GS-DNH) et/ou aldéhyde déshydrogénase (ALDH-) catalyse l'oxydation en glutathionyl-HNA (GS-HNA) ; (ii) à des niveaux de stress modérés, les 4-HNE subissent une oxydation catalysée par l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH-) donnant HNA, qui sera métabolisé à son tour dans les mitochondries par le cytochrome P450 pour former 9 hydroxy-HNA ; et (iii) à des niveaux de stress élevés, le 4-HNE est alors métabolisé par l'ADH pour produire de la DNH^{135, 136, 137, 138, 139}.

En perturbant le gène *Gsta4* qui code pour la glutathion s-transférase (GST) l'isozyme GSTA4-4 chez la souris a montré que GSTA4-4 joue un rôle majeur dans la protection des cellules contre les effets toxiques des oxydants en atténuant l'accumulation de 4-HNE ¹⁴⁰. La surexpression et l'inhibition de l'activité de l'ALDH diminuent et augmentent, respectivement, la toxicité 4-HNE et les adduits du 4-HNE aux protéines dans la culture cellulaire ¹⁴¹.

En fonction du type cellulaire, la capacité de réparation de l'ADN ou la capacité d'adaptation métabolique, le 4-HNE peut activer la prolifération et favoriser la survie cellulaire ou stopper la division cellulaire, et après un arrêt prolongé, les cellules entrent en apoptose. Le 4-HNE peut induire ces processus par la modulation de plusieurs facteurs de transcription sensibles au stress tels que Nrf2, AP-1, NF-KB, et PPAR ou en modulant plusieurs voies de signalisation, y compris MAPK (p38, Erk et JNK), la protéine kinase B, isoformes de la protéine kinase C, régulateurs du cycle cellulaire, les récepteurs tyrosine kinases et les caspases. Selon les concentrations de 4-HNE les cellules entrent en apoptose ou nécrose. Par exemple, la cytotoxicité du 4-HNE sur les cellules HepG2 a été évaluée. Les concentrations de 4-HNE variaient de 10 à 100 nM. Les concentrations de 4-HNE de 5-40 nM a causé la mort par apoptose. Enfin, une augmentation significative de la population de cellules nécrotiques, soit 31,8% et 55,4 %, a été observée dans des cellules traitées avec 80 et 100 nM de 4-HNE, respectivement¹⁴². Ces résultats montrent que le 4-HNE induit l'apoptose à faible concentration et la nécrose à forte concentration. Une multitude de mécanismes sont employés par p53 pour assurer une induction efficace de l'apoptose ¹⁴³. 4-HNE régule l'activation de p53 et pourrait être l'un des mécanismes responsables de l'apoptose dans de nombreux types cellulaire. Par exemple, dans les cellules SH-SY5Y le stress oxydatif induit par le 4-HNE a été associé à une

augmentation de la transcription d'expressions de Bax et p53 ; ces événements déclenchent la mort cellulaire ¹⁴⁴.

La 4-HNE peut induire l'apoptose grâce aux récepteurs de mort cellulaire Fas (CD95) ainsi que par la voie intrinsèque p53-dépendante. Ces mécanismes peuvent être résumés comme suit : (i) 4- HNE diffuse et peut interagir avec Fas (CD95/Apo1) sur la membrane plasmique et réguler/activer son expression par l'activation des kinases d'aval (ASK1 et JNK), ce qui conduit à l'activation de la caspase-3 et se termine par l'apoptose ; (ii) le 4-HNE interagit avec p53 qui provoque son activation, sa phosphorylation, et sa translocation nucléaire. Dans le noyau p53 inhibe transcription des gènes antiapoptotiques (Bcl2) et favorise la transcription de gènes proapoptotiques (Bax) ou de gènes du cycle cellulaire (p21) conduisant à l'activation de la caspase-3, et se terminant par l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire, respectivement ; (iii) le 4-HNE induit également un feedback négatif sur Fas, par un mécanisme impliquant la transcription de Daxx, une protéine nucléaire qui est associée à des facteurs de transcription impliqués en réponse au stress se liant à l'ADN. Le 4-HNE interagit avec Daxx, lié à HSF1, transloque Daxx du noyau au cytoplasme où il se lie à Fas, et inhibe l'activation de ASK1 pour limiter l'apoptose¹⁴⁵.

2. Potentiel Red/ox après traitement :

En plus de leur rôle dans les progéniteurs normaux, les ROS et aldéhydes peuvent être importants dans la transformation leucémique. ¹⁴⁶ Par exemple, dans un modèle FLT3 de LAM, le stress oxydatif après inactivation du gène suppresseur de tumeur DP-1, joue un rôle crucial dans la transformation leucémique ¹⁴⁷. La production de ROS et les gènes de réponse au stress oxydatif sont plus élevés dans la LAM que dans les leucocytes normaux, et les marqueurs du stress oxydatif augmentent en cas de rechute^{148,149}. Les niveaux de ROS dans la LAM entraînent des dommages à l'ADN ainsi qu'une altération de la progression du cycle cellulaire et la transduction du signal, y compris les voies de prolifération.

a. Quelles sont les thérapies qui perturbent le système redox :

Plusieurs résultats expérimentaux ont démontré que l'augmentation des ROS dans les cellules cancéreuses peut jouer un rôle important dans l'initiation et la

progression du cancer^{150,151}. Cependant, des niveaux excessifs de stress ROS peuvent également être toxiques pour les cellules : les cellules tumorales avec un stress oxydatif accru sont susceptibles d'être plus vulnérables aux dommages en raison de l'exposition des ROS induites par des agents exogènes¹⁵². Par conséquent, manipuler les niveaux de ROS est un moyen de tuer sélectivement les cellules cancéreuses sans causer d'effets secondaires importants¹⁵³. Au cours des dernières années, un nombre croissant de résultats expérimentaux a indiqué que l'augmentation des ROS est impliquée dans l'induction de l'apoptose par des agents anticancéreux.

Beaucoup d'agents antitumoraux, comme la vinblastine, le cisplatine, la mitomycineC, la doxorubicine, présentent une activité antitumorale via l'activation de l'apoptose ROS-dépendante, ce qui suggère un intérêt potentiel des ROS comme agent antitumoral. La vinblastine appartient à la classe des vinca-alcaloïdes qui comprend la vinorelbine, la vincristine, la vinblastine et la vindésine. Ces substances se lient à la tubuline en tant qu'inhibiteurs puissants de la polymérisation de microtubules mitotiques. Il a été démontré que la vinblastine a induit une perte de potentielle transmembranaire des mitochondries et l'apoptose via la voie des caspases. Le rôle joué par les ROS semble être essentiel pour induire la downregulation de Mcl-1 par la voie aberrante de JNK et induit des dommages à l'ADN suivis de dysfonction mitochondriales¹⁵⁴.

Le cisplatine est l'un des cytotoxiques les plus couramment utilisés, par exemple, dans les cancers de la tête et du cou, les poumons, les ovaires, la vessie. Le "mécanisme classique" entraînant l'apoptose implique une liaison covalente du cisplatine avec des bases de guanine sur l'ADN ; la formation de liaisons inter et intra-brin ; l'induction de p53, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Plus récemment, il a été montré que les ROS générées par le cisplatine pouvaient augmenter la peroxydation lipidique¹⁵⁵.

Il a été démontré que la mitomycine C induit l'apoptose par rupture des brins d'ADN et l'augmentation des ROS¹⁵⁶. Récemment, il a été rapporté que tétrathiomolybdate, un agent anticancéreux agissant par l'intermédiaire de l'inhibition de la SOD1 et par l'élévation des niveaux de ROS, augmente l'apoptose dans les cellules cancéreuses de l'ovaire. L'augmentation de la cytotoxicité a été corrélée avec l'activité des ROS, l'apparition d'un marqueur pro-apoptotique¹⁵⁷.

La doxorubicine est une anthracycline et inhibiteur de la topoisomérase¹⁵⁸. La toxicité à l'égard des cardiomyocytes et l'induction de l'apoptose des cellules cancéreuses est médiée par les dommages à l'ADN générés par le stress oxydatif à travers l'activation de PARP et NAD(P)H oxydase¹⁵⁹.

Camptothécine, un inhibiteur des topoisomérases, est un alcaloïde végétal provenant de *Camptotheca acuminata*. La camptothécine agit sur les cellules cancéreuses en inhibant la topoisomérase 1, une enzyme qui, de façon covalente relie la tyrosine au phosphate de l'ADN à l'extrémité 3' de l'ADN libre tout en générant une extrémité 5'-hydroxyle à l'autre bout. Le topotécan (Hycamtin) entraîne la production de ROS et induit l'apoptose. Dans le médulloblastome traité par camptothécine, les ROS étaient élevées mais les antioxydants tels que le glutathion et le N-acétyl-cystéine empêchés la mort cellulaire¹⁶⁰.

3. Les ALDH dans la LAM :

En plus de jouer éventuellement un rôle dans la transformation maligne en AML, la présence d'une activité élevée ALDH dans les cellules leucémiques humaines sont probablement des agents de résistance au cyclophosphamide et d'autres classes pharmacologiques identiques¹⁶¹. Les ALDH assurent la détoxification irréversible du précurseur du cyclophosphamide (Cy) en catalysant l'oxydation de son métabolite intermédiaire, l'aldophosphamide (AP) en carboxyphosphamide inactif¹⁶². Les cancers sont hétérogènes en ce qui concerne l'activité de l'ALDH. Pour certaines LAM et autres hémopathies malignes qui expriment de faibles niveaux d'activité ALDH, l'expression différentielle d'ALDH entre les cellules tumorales et les CSH normales peut être exploitée pour développer des approches thérapeutiques. Récemment, le Cy a été administré aux patients greffés haplo-identiques dans le but d'éliminer les effecteurs immunitaires alloréactifs qui causent la GvHD, tandis que les CSH du donneur, qui expriment des niveaux élevés d'ALDH sont épargnées et peuvent générer des cellules hématopoïétiques saines¹⁶³.

Plus précisément, les LAM dépourvus d'ALDH1A1 sont plus sensibles aux composés qui génèrent directement ou indirectement des substrats toxiques comme les ROS, alors que les CSH normales à forts niveaux d'ALDH1A1 sont relativement résistants¹⁶⁴. De même, comprendre la biologie des ALDH dans les cellules

effectrices immunitaires pourrait prévenir et traiter la GvHD, ainsi que d'autres maladies immunitaires.

Une petite population de cellules malignes résistantes au traitement, appelée cellules souches leucémiques (CSL) qui ont une capacité d'auto-renouvellement et la capacité ultérieure de générer un grand nombre de cellules leucémiques différenciées¹⁶⁵. Ces dernières années, de nombreux efforts ont été déployés pour détecter et éliminer spécifiquement ces CSL. Certaines données suggèrent que les cellules leucémiques présentant un niveau élevé de coloration Aldefluor (permettant de mesurer l'ALDH) peuvent être relativement enrichies en cellules souches leucémiques¹⁶⁶. Cependant, d'autres études ont suggéré que, au moins dans des échantillons de moelle osseuse de patients le phénotype CD34⁺CD38⁻ ALDH^{bright} correspond au CSH normaux¹⁶⁷. En soutien à l'affirmation selon laquelle les CSH et les CSL peuvent avoir un profil ALDH différent, des études récentes utilisant la moelle osseuse de patients traités pour une LAM ont démontré que les cellules CD34⁺CD38⁻ exprimant des niveaux intermédiaires d'ALDH déterminés par la coloration à l'Aldefluor semblent être des CSL et peuvent être les principaux médiateurs de la résistance aux chimiothérapies et source de la rechute¹⁶⁸. Les possibilités pour cela incluent a) les CSL expriment des niveaux inférieurs d'ALDH1A1 que ceux des CSH, b) ALDH1A1 a une activité enzymatique différente pour Aldefluor dans les CSL que les CSH ou c) les CSL expriment des ALDH autres que ALDH1A1 qui utilisent moins efficacement le substrat Aldefluor que ALDH1A1. Que différentes isoformes d'ALDH pourraient contribuer aux profils d'activité ALDH en utilisant la coloration Aldefluor a déjà été montré pour ALDH1A2, 1A3, 2 et 3A1. D'un point de vue pratique, détecter les CSL à l'aide d'Aldefluor ou d'autres outils pour mesurer les ALDH après un traitement de chimiothérapie ou un traitement de greffe de moelle osseuse peut être utile pour détecter la MRD. La MRD étant un facteur prédictif important de rechute dans la LAM et les maladies apparentées, la détection des CSL survivantes peut avoir des implications thérapeutiques. De plus, si les CSL ont des niveaux inférieurs d'ALDH que les CSH, il pourrait être possible de développer des approches qui exploitent cette différence.

4. Le GSH dans le modèle redox :

Le GSH est essentiel à la survie cellulaire la déplétion en GSH après un KO entraîne une apoptose cellulaire massive ¹⁶⁹. La disponibilité de la cystéine étant le facteur limitant dans la formation de GSH, il a été démontré que la restriction en cystéine entraîne l'apoptose par épuisement du GSH ¹⁷⁰. Plusieurs études ont montré une corrélation entre l'appauvrissement en GSH et l'augmentation de l'apoptose ¹⁷¹. Inversement, la surexpression de g-GCS protège contre l'apoptose induite par des stimuli activant la mort cellulaire extrinsèque et intrinsèque ¹⁷². g-GCS est un hétérodimère d'une sous-unité catalytique et une sous-unité de régulation. Le promoteur de g-GCS contient de nombreux éléments comprenant la reconnaissance des sites de liaison à la protéine activatrice 1 (AP-1 ou TRE), protéine activatrice 2 (AP-2), Sp-1, facteur nucléaire k-B (NF-kB), et l'EpRE (également appelé élément de réponse antioxydant). EpRE est l'élément la régulation du gène dépendante du facteur 2 (Nrf2) lié à NF-E2expression ¹⁷³. Il a été démontré que la régulation négative de Nrf2 réduit l'expression des gènes de g-GCS et diminue les niveaux de GSH ¹⁷⁴ et des enzymes dépendantes du GSH ¹⁷⁵. Fait intéressant, les taux élevés de Nrf2 ont été directement associés à la résistance à l'apoptose ¹⁷⁶. Nrf2 est également connu pour protéger contre le stress oxydatif en régulant à la hausse les enzymes impliquées dans la biosynthèse, l'utilisation et l'exportation du GSH ¹⁷⁷. Des taux élevés de GSH intracellulaire ont été associés à des phénotypes de résistance à l'apoptose ¹⁷⁸. Par exemple, l'appauvrissement en GSH induit par la buthionine sulfoximine (BSO) ne déclenche pas l'apoptose, mais potentialise la mort induite par les récepteurs de mort cellulaire présent sur les Lymphocytes T ¹⁷⁹. La supplémentation en GSH avec le N-acétyl-L-cystéine (NAC) empêche également l'apoptose ¹⁸⁰. La reconstitution du pool de GSH intracellulaires avec des acides aminés soufrés y compris la S-adénosyl-méthionine, précurseur du GSH par la conversion séquentielle de la S-adénosylhomocystéine(SAH) en cystéine, a également été efficace pour protéger de l'apoptose¹⁸¹. À l'heure actuelle, la contribution précise du pool de GSH cytosoliques Vs mitochondriaux dans l'apoptose n'est pas complètement compris. Certains rapports suggèrent que l'apoptose est directement corrélée à l'épuisement du GSH cytosolique plutôt que mitochondrial ¹⁸². Cependant, d'autres études ont montré que l'appauvrissement mitochondrial en GSH

est important pour déclencher la cascade de mort cellulaire. Les thiols mitochondriaux ont clairement démontré qu'ils agissent comme régulateurs de l'apoptose ¹⁸³. L'appauvrissement sélectif du GSH mitochondrial sensibilise les cellules au stress oxydatif induisant l'apoptose ¹⁸⁴. Les mitochondries dépendent du GSH pour la prévention des dommages lié au stress oxydatif dus à la respiration aérobie. La récupération du glutathion-disulfure (GSSG) par GSH réductase (GR) et l'absorption de GSH cytosolique à travers la membrane externe sont nécessaires pour le maintien des niveaux de GSH mitochondriaux parce que ces organites sont incapables de le synthétiser de novo. Il a également été proposé que le GSH doit être activement transporté dans les mitochondries ou changé contre un autre anion. Récemment, l'inhibition des transporteurs du GSH par les mitochondries, induit par un stress oxydatif, libère le cytochrome c (Cyt c) active le caspase¹⁸⁵ et entraîne l'apoptose ¹⁸⁶. L'épuisement du GSH intracellulaire est une des premières marques de la mort cellulaire en réponse à différents stimuli 3,4. Le stress oxydatif induit par les chimiothérapies entraîne l'oxydation du GSH en GSSG par les ROS ¹⁸⁷. Ainsi les agents cytotoxiques diminuent les taux de GSH et est un des mécanismes qui participent à l'apoptose. L'inhibition de l'appauvrissement en GSH dans ces conditions peut permettre de sauver la cellule de l'apoptose. ¹⁸⁸

Les voies intrinsèques de l'apoptose impliquent les mitochondries, l'ER et les voies de dommage à l'ADN. Celles-ci sont activées par une grande variété de stimuli, y compris les chimiothérapies les polluants environnementaux, le stress (radiations, hyperglycémie, hypoxie, stress oxydatif et osmotique). L'activation de la voie des mitochondries intervient quand la libération du Cyt c est associée à l'ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriale (MPTP) et la perte du potentiel de la membrane mitochondriale.

Des études *in vitro* ont montré qu'une réduction en GSH est nécessaire à la formation de l'apoptosome. L'appauvrissement en GSH active la voie intrinsèque de l'apoptose grâce à la dimérisation de BAX dépendante de l'oxydation. Il a également été démontré que l'épuisement du GSH ¹⁸⁹ déclenche le Cyt qui doit être oxydées pour pouvoir montrer son action pro-apoptotique, ce qui nécessiterait des niveaux de GSH cytosoliques épuisés ¹⁹⁰. Récemment, il a été démontré que dans les neurones sains et les cellules cancéreuses, le Cyt c est réduit et maintenu inactif par

l'augmentation de GSH, générée par le métabolisme du glucose par la voie du pentose phosphate¹⁹¹. Le rôle anti-apoptotique de Bcl-2 est largement lié au GSH. Il a été démontré que Bcl-2 régule le contenu en GSH. La surexpression de Bcl-2 augmente les niveaux de GSH ¹⁹². Des études récentes suggèrent que Bcl-2 pourrait réguler le pool de GSH mitochondrial en une interaction directe du GSH avec BH3, qui régule les fonctions antioxydantes. ¹⁹³

Des rapports récents suggèrent un rôle critique du pool de GSH nucléaire dans la protection de l'ADN contre les modifications oxydatives pouvant altérer l'efficacité de la réparation de l'ADN. On pense que le pool nucléaire de GSH est maintenu par la diffusion de GSH cytosolique dans le noyau à travers des pores nucléaires ¹⁹⁴. La conjugaison du GSH est un aspect essentiel du métabolisme physiologique. Les glutathion S-transférases (GST) forment une classe enzymatique avec des spécificités de substrat qui génèrent un grand nombre de thioesters, appelés glutathion S-conjugué. Les GST peuvent servir comme peroxydases, isomérases et de thiol transférases. Les GST protègent contre l'apoptose induite par les dommages à l'ADN en éliminant la formation de lipides peroxydés du au stress oxydatif ¹⁹⁵. L'ADN mitochondrial peut lui aussi être endommagé et sa réparation est dépendante du GSH ¹⁹⁶. Les agents endommageant l'ADN, tels que le cisplatine, ont induit l'apoptose grâce à l'épuisement du GSH. En outre, l'apoptose induite par la doxorubicine, agent intercalant de l'ADN s'est avéré potentialisé par l'épuisement du GSH par le BSO¹⁹⁷.

Le GSH constitue la principale défense intracellulaire antioxydante contre les ROS et le stress oxydatif. Le GSH a montré qu'il pouvait métaboliser une grande variété de ROS, anion superoxyde (KO_2), hydroxyle (KOH), oxygène singulet (1O_2), en faisant don d'électrons ce qui leur permettait d'être oxydé en thyl radical (GSK). La génération de liaisons disulfure entre deux GSK conduit à la formation de GSSG. Le GSH détoxifie également les cellules des peroxydes tels que des hydroperoxydes (H_2O_2), peroxydrite (OONO) et les lipides peroxydé (LOOK) par l'action GSH peroxydases (GPX) et des peroxiredoxines (PXR). L'accumulation de GSSG durant le stress oxydatif est toxique pour la cellule. Le GSSG induit directement l'apoptose par l'activation de la voie SAPK /MAPK ¹⁹⁸. Une augmentation précoce et transitoire

du GSSG précède la libération de Cyt c et l'activation de la caspase 3 pendant l'apoptose. Dans ces études, le ratio GSH /GSSG revenait à la normale 1 h après les stimuli apoptotiques ¹⁹⁹. GSSG est retransformé en GSH par l'action de GR, ce qui nécessite la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) réduite. Dans les conditions physiologiques le GSSG est maintenu à 1% du glutathion cellulaire total. Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), première enzyme du cycle pentose phosphate oxydé, est indispensable pour la régénération du NADPH à partir de NADPp ²⁰⁰. La G6PD aussi contribue au maintien des disulfures de protéines (protéines-SSG) dans la cellule ²⁰¹. La déficience en G6PD sensibilise les cellules à l'apoptose induite par le stress oxydatif ²⁰². L'épuisement du GSH au cours de l'apoptose est également accompagné d'une diminution du NADPH disponible, ce qui pourrait contribuer à un maintien du déséquilibre rédox en empêchant la réduction du GSSG par le GR ²⁰³. L'augmentation de la formation de NADPH, par la voie des pentoses, protège contre l'apoptose induite par les récepteurs de mort cellulaire²⁰⁴ ²⁰⁵. En outre, le GSSG a également été montré pour être désintoxifié par son efflux à travers la membrane plasmique. ²⁰⁶

5. Régulation du potentiel redox :

Outre les antioxydants, les facteurs de transcription tel que le nuclear factor erythroid 2-related factor (NRF2) et forkhead box O (FOXO) sont essentiels à la régulation de l'expression des antioxydants. Dans des conditions normales, NRF2 se localise dans le cytoplasme, où il interagit avec la protéine de liaison à l'actine KEAP1 ^{207,208}. KEAP1 fonctionne comme un adaptateur et cible NRF2 pour la dégradation dans le protéasome ²⁰⁹. Lors de l'activation de la voie, NRF2 se dissocie de KEAP1 et se transloque dans le noyau, s'hétérodimérise avec de petites protéines MAF, puis se lie à antioxydant-responsive elements (ARE) dans la région régulatrice de nombreux gènes. NRF2 module la transcription d'environ 200 gènes dont des protéines qui agissent en tant qu'antioxydants, enzymes de détoxification, heat shock proteins et enzymes de synthèse du GSH. Ces protéines jouent toutes un rôle dans la défense cellulaire contre le stress oxydatif ²¹⁰. NRF2 active également des enzymes antioxydantes telles que l'hème oxygénase-1, les PRX, la catalase, les GPX, le SOD2 et le TRX. De plus, NRF2 régule la synthèse de novo du GSH en (1) activant

l'expression de la glutamylcystéine synthétase²¹¹ et en (2) contrôlant l'abondance de la cystéine dans les cellules, substrat indispensable à la synthèse du GSH. Ceci est régulé par l'expression du transporteur cystéine/glutamate (xCT)²¹². En échange de glutamate, xCT importe de la cystéine. FOXO contrôlent également les niveaux de ROS en favorisant l'expression de gènes associés à l'arrêt du cycle cellulaire, à l'apoptose et à la défense antioxydante^{213; 214}. La régulation des niveaux de ROS intracellulaires par la production de ROS et leur élimination est essentielle au contrôle de divers événements de signalisation cellulaire. Elle est utilisée par les cellules normales et les cellules cancéreuses pour soutenir la signalisation nécessaire à la prolifération cellulaire, à l'angiogenèse, à l'invasion et à la survie. Il est intéressant de noter que les cellules cancéreuses utilisent également des systèmes de balayage des ROS, y compris NRF2 et les systèmes antioxydants connexes, pour contrôler leur phénotype de stress oxydatif afin de prévenir la mort cellulaire^{215, 216}. Cette section portera sur la manière dont les ROS favorisent la signalisation cellulaire, ce qui jettera les bases pour étudier le rôle contradictoire des ROS dans le cancer.

II. LE DIMATE :

1. Travaux déjà effectués :

Il est important de noter que les ROS sont impliqués dans l'hématopoïèse normale. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) ont un potentiel d'auto-réplication. Les fluctuations des taux des niveaux de ROS contrôlent leur capacité d'auto-renouvellement et de prolifération ²¹⁷. Les CSH se trouvent principalement dans un état de repos dans la niche des cellules souches dans la moelle osseuse ²¹⁸. Cette élévation des niveaux de ROS peut modifier le phénotype des CSH dans la circulation sanguine.

L'élévation de la concentration en oxygène peut limiter la durée de vie des CSH ²¹⁹. Une analyse des populations CD34+CD38- (populations HSC) dans un modèle de transplantation, a constaté que la capacité de prolifération et de repeuplement des CSH ont diminué avec des niveaux élevés de ROS. En outre, lorsqu'ils sont séparés par niveau de ROS, les cellules ROSlow CD34+CD38- ont conservé leur potentiel de réplication, qui a été perdu dans les cellules ROShigh. ²²⁰

Il est intéressant de noter qu'un phénomène similaire peut se produire dans les CSL. Plus précisément, les CSL ROSlow conservent la capacité de se greffer et de se développer en cellules blastiques aussi bien en population ROSlow et ROShigh. D'autre part, les CSL ROShigh sont plus actives métaboliquement, ont un taux d'auto-renouvellement in vivo plus faible, et ont plus de dommages à l'ADN que leur ROSlow ²²¹. Ainsi, les ROS jouent des rôles similaires dans les l'hématopoïèse et dans la leucémogénèse : favoriser la prolifération, mais en limitant la pluripotence par la promotion de la différenciation.

Les ALDH ont été largement associées à des phénotypes de résistances aux médicaments. Dans les LAM, la famille de gènes ALDH se trouve amplifiée dans 42% des cas, ce qui a également un impact délétère sur l'espérance de vie ²²². Ces données suggèrent que la modification de l'activité à la hausse de l'ALDH dans la lutte contre la LAM confère des avantages pour la prolifération, la survie des cellules

et/ou pour la progression de la maladie. DIMATE est décrit comme un inhibiteur irréversible des ALDH1 et ALDH3. Par conséquent, nous avons évalué la capacité du DIMATE à inhiber l'activité ALDH dans les cellules leucémiques ²²³. La cytotoxicité sélective de DIMATE sur les cellules cancéreuses a déjà été démontrée in vitro sur des cellules cancéreuses épithéliales. En effet, le DIMATE induit une apoptose dans les cellules humaines de cancer épithélial de la prostate DU145, mais il est un agent cytostatique réversible sur les cellules normales de prostate. ²²⁴

Les chimiothérapies conventionnelles ont les mêmes effets cytotoxiques sur les CSH normales ou leucémiques. Il a été démontré que DIMATE, par l'inhibition de l'ALDH, a ciblé et éradiqué in vitro et in vivo plusieurs lignées cellulaires humaines de leucémie et de cellules leucémiques humaines très enrichi en CSL, mais épargne les CSH saines. Le plus intéressant, c'est qu'il a été déterminé une zone thérapeutique, entre 5 et 9 $\mu\text{mol/l}$, où le DIMATE a éradiqué tous les CSL (100% de la létalité) et a montré une faible toxicité (moins de 3 % de la létalité) sur les CSH saines. En outre, avec de telles concentrations de traitement, les CSH normales ont conservé leur capacité d'auto-renouvellement et de différenciation.

2. Mode d'action :

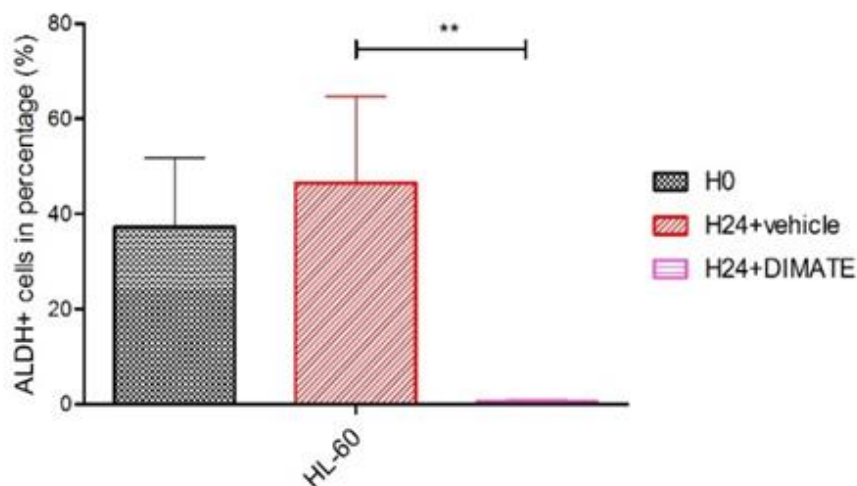


Figure 7 : Evolution du niveau d'expression d'ALDH après traitement par DIMATE

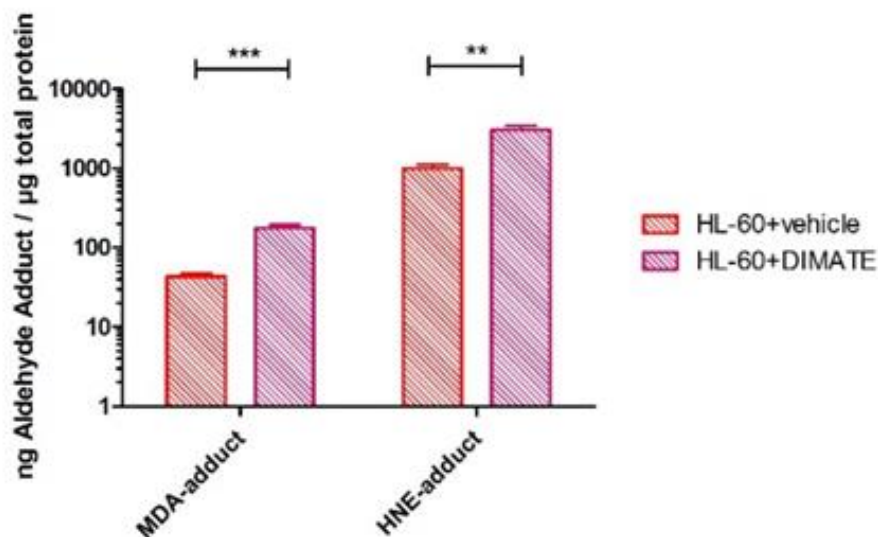


Figure 8 : Formation d'adduit avec MDA et HNE en fonction du traitement par DIMATE

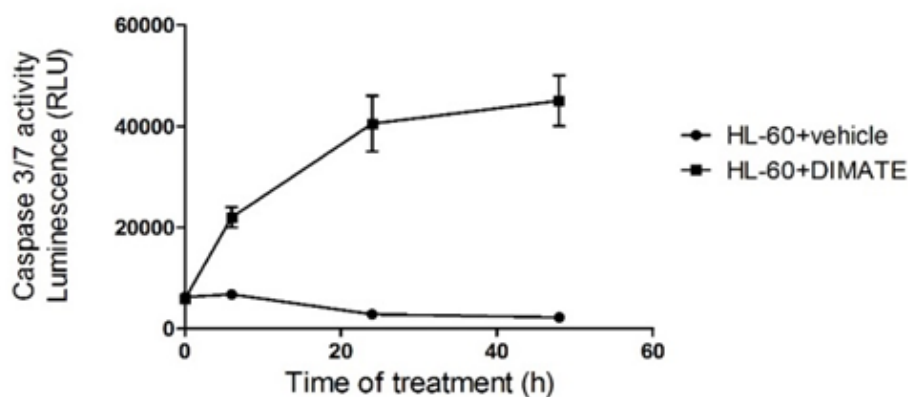


Figure 9 : Evolution de l'activité Caspase 3/7 avec le temps en fonction du traitement par DIMATE ou placebo.

L'inhibition des ALDH par le DIMATE induit l'apoptose des cellules tumorales de lignées cellulaire de LAM par l'accumulation d'aldéhyde toxique induisant la mort cellulaire programmée. La figure (7) montre l'activité ALDH en cytométrie de flux sur les HL-60. Le graphique représente le taux d'ALDH+ sur les cellules en culture à H0 et après 24h avec ou sans DIMATE à 5µmol/l. La figure (8) quantifie MDA et HNE dans les HL-60 traités par le DIMATE 5 µmol/l durant 24h. La formation d'adduit toxique est plus élevée dans les cellules traitées que sans. Le monitoring des caspases 3/7 sur la figure (9) montrent qu'après 6h de traitement une augmentation de leurs activités est observée.

Au total, le traitement des HL-60 par DIMATE 24h montre une inhibition de l'activité ALDH qui entraîne une accumulation, de MDA/HNE et active l'apoptose par la voie dépendante des caspases.

III. RESULTATS EXPERIMENTAUX :

Modulation in vitro/ex vivo des voies redox:

1. Variations des ROS/ALDH par le traitement :

Le potentiel redox est modifié par les traitements habituels que les patients reçoivent en première ligne de chimiothérapie. L'AraC et la daunorubicine sont les 2 drogues les plus utilisées. Comme tout traitement de chimiothérapie, et en particulier la daunorubicine sont connues pour entraîner l'apoptose des cellules tumorales via différents mécanismes. Un des mécanismes est la production de ROS. Nous nous sommes intéressé ici à l'AraC et ses capacités à augmenter le potentiel redox dans les cellules étudiées.

L'étude chez les patients montre que les ROS, les ALDH augmentent au fur et à mesure des lignes de traitements reçues.

La population :

Les critères d'inclusion : LAM de novo ou secondaire au diagnostique ou à la rechute, sauf pour le type M3 selon la classification franco-américain-britannique, sans limite d'âge. De septembre 2015 à avril 2019, 97 patients ont été recensés à l'Assistance publique des hôpitaux de Marseille. L'âge médian des 97 patients était de 68 ans (fourchette : 24-93), 56 (58%) étaient de sexe masculin et 41 (42%) de sexe féminin. La RC était définie par la présence de blastes <5% au myélogramme, avec $>1 \times 10^9/L$ de neutrophiles et $>100 \times 10^9/L$ de plaquettes sans maladie extra-médullaire détectable. Les patients qui répondaient aux critères ci-dessus mais dont le nombre de neutrophiles ou de plaquettes était inférieur aux valeurs indiquées

étaient considérés comme ayant atteint la RC (RC avec récupération incomplète du nombre de GB).

Caractéristiques cliniques	Nb, (%)
Echantillon	156
Patient	97
Age	
Median	68,6
Range	24-93
Sexe	
Homme	59 (60,8)
Femme	38 (39,2)
Type d'échantillon	
Sang	57 (36,5)
Moelle osseuse	99 (63,5)
Maladie	
LAM	143 (91,7)
SMD	13 (8,3)
ELN 2017 (LAM seulement)	
Favorable	30 (20,9)
Intermédiaire	53 (37,1)
Défavorable	53 (37,1)
Indéterminé	7(4,9)
Lignes de traitements	
Diagnostic	71 (45,5)
Première ligne	59(37,8)
Second ligne	17(10,9)
Troisième ligne	9(5,8)

Tableau 4 : Population générale

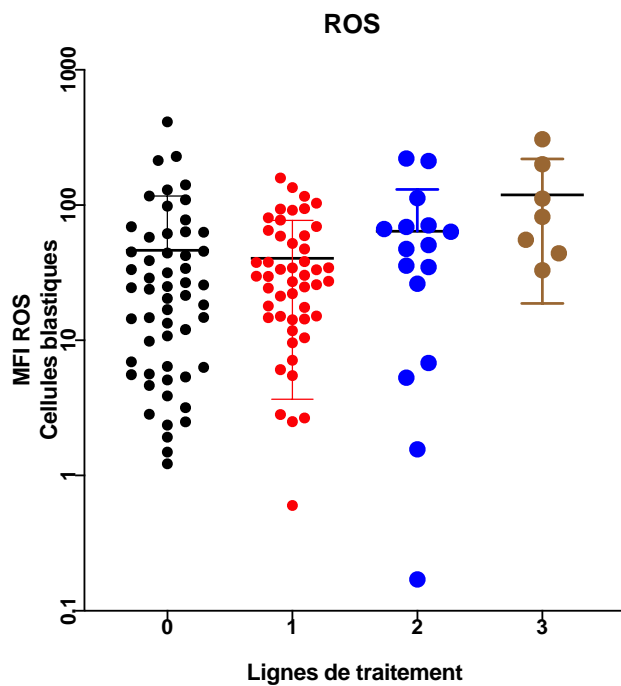


Figure 10 : Evolution de la MFI ROS des cellules tumorales en fonction du nombre de lignes de traitement reçues

Les données présentées sont celles disponibles après gating sur les cellules CD 34⁺. Au diagnostic donc sans traitement, « ligne de traitement 0 », la moyenne de MFI des ROS était de 46,17 (déviations standard 70,29, min 1,2, max 411,7). La première ligne comprend les patients ayant bénéficié de l'induction seul ou avec les consolidations par aracytine. La moyenne de MFI des ROS, pour ce sous groupe, était de 40,37 (déviations standard 40,37, min 0,6-max 158,3).

La deuxième ligne retrouve une moyenne 63,83 (déviations standard 66,77, min 0,17-max 220,2). Enfin en troisième ligne, la moyenne était de 118,7 (déviations standard 99,98, min 32,86-max 305,8). Il existe une différence significative entre la MFI des ROS en fonction des lignes de traitements. ($p < 0,0135$ selon Kruskal Wallis).

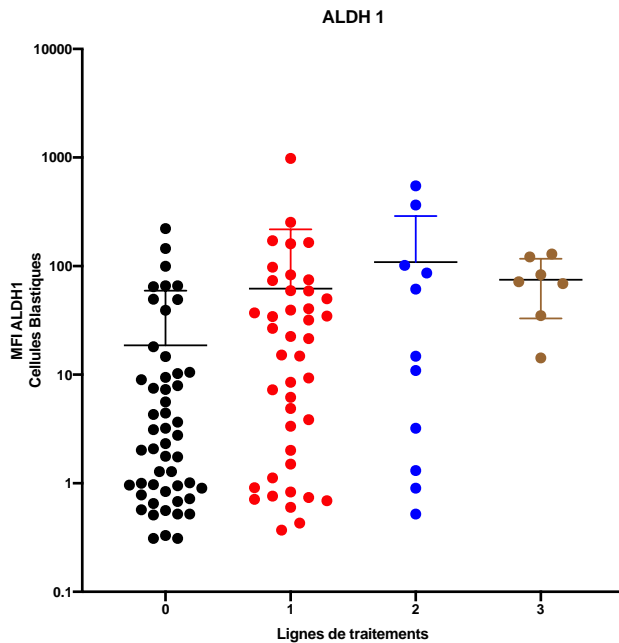


Figure 11: Evolution de l'activité ALDH1 dans les cellules tumorales en fonction du nombre ligne de traitement reçu.

Au diagnostic la moyenne l'activité des ALDH1 était de 18,59 (déviation standard 40,73, min 0,31- max 221,5). A la 1^{ère} ligne la moyenne d'activité ALDH1 passe à 61,92 (déviation standard 155,8, min 0,37-max 981,2). En 2^{ème} ligne elle était de 108,6 (déviation standard 180,6, min 0,52-max 548). L'activité en 3^{ème} ligne montait à 74,8 (déviation standrad 41,78, min 14,26-max 129,1). Il existe une différence significative entre l'activité ALDH1 en fonction des différentes lignes de traitement. ($p < 0,0007$ selon Kruskal-Wallis test).

Les échantillons proviennent du sang ou de la moelle. Nous avons comparé les ROS ainsi que les ALDH 1 dans les 2 types d'échantillons. Il n'existe aucune différence statistique selon qu'il s'agit du sang ou de la moelle osseuse.

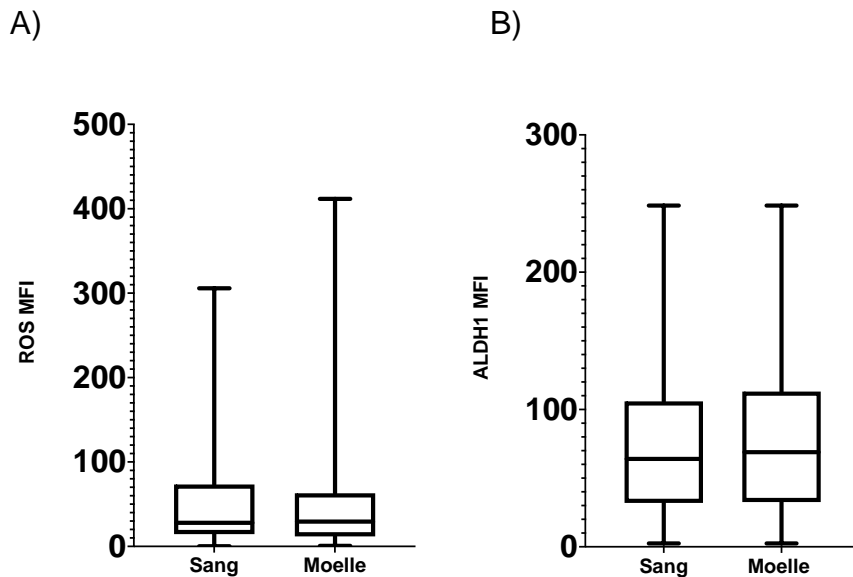


Figure 12 : Comparaison sang/moelle pour ROS et ALDH

A) MFI ROS dans le sang et la moelle osseuse **B)** Activité ALDH1 dans le sang et la moelle osseuse

2. Mécanisme de modification du potentiel redox in vitro:

a. Matériel et méthodes :

Culture et traitement des lignées cellulaires :

10 lignées cellulaires LAM ont été cultivées dans du RPMI-1640 GlutaMAX (Gibco, #61870-10) complété par 10 % de sérum bovin foetal (FBS) inactivé par la chaleur (Gibco, #10270-106).

Les lignées cellulaires LAM ont été mises en plaque à $5 \cdot 10^5$ cellules/3ml dans des plaques à 6 puits dans un incubateur à 37°C, 5% CO₂. Les lignées cellulaires de LAM ont été non traitées et traitées avec une concentration d'aracytine conduisant à une viabilité totale de 60 à 80 %. La production de ROS, l'activité ALDH et la peroxydation des lipides ont été mesurées après 14, 24 et 48 heures de traitement.

i. Détection des ROS

Un minimum de 200 000 cellules ont été resuspendues dans un 250µL RPMI sans rouge de phénol (Gibco, #11835-030). La production de ROS a été contrôlée à l'aide du détecteur de ROS DCFDA avec une concentration finale de 2µM. Les cellules

avec une solution de H2DCFDA ont été incubées dans une atmosphère à 37°C, 5% CO2. De l'iodure de propidium a été ajouté aux cellules à une concentration finale de 16µg/ml juste avant l'acquisition.

Un total de 5000 éléments vivants positifs ROS ont été acquis sur le LSR Fortessa (BECTON DICKINSON). Les données ont été analysées avec le logiciel d'analyse Kaluza v1.5a (Beckman Coulter).

ii. Activité ALDH

200 000 cellules ont été remises en suspension dans 250µl de RPMI sans rouge de phénol. Le propional de la résorufine et le benzoate de résorufine, deux substrats des enzymes ALDH, ont été utilisés pour mesurer respectivement l'activité de l'ALDH1 et de l'ALDH3. Ces deux substrats ont été ajoutés aux cellules à une concentration finale de 0,5µM et incubés dans une atmosphère à 37°C, 5% de CO2 pendant 30 minutes. Un total de 5000 éléments vivants positifs pour l'ALDH ont été acquis sur le cytomètre avec le le fluorochrome APC.

iii. Peroxydation des lipides

La peroxydation des lipides a été mesurée avec le kit de peroxydation des lipides Image-IT (Life Technologies) dans lequel le réactif BODIPY 581/591 C11 est un reporter fluorescent sensible pour la peroxydation des lipides. Lors de l'oxydation dans des cellules vivantes, la fluorescence de BODIPY® passe du rouge au vert, ce qui donne une indication de la dégradation oxydative des lipides cellulaires par les espèces réactives de l'oxygène.

200 000 cellules ont été mises en plaque dans une plaque de 12 puits, en 1ml. Image- iT® Lipid Peroxidation Sensor a été ajouté aux cellules à une concentration finale de 10µM puis incubé pendant 30 minutes à 37°C. Le milieu a été retiré et les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS. Au total, 5000 événements ont été acquis sur le cytomètre.

b. Résultats :

i. Evaluation des ROS/ALDH/Péroxidation lipidique en cytométrie :

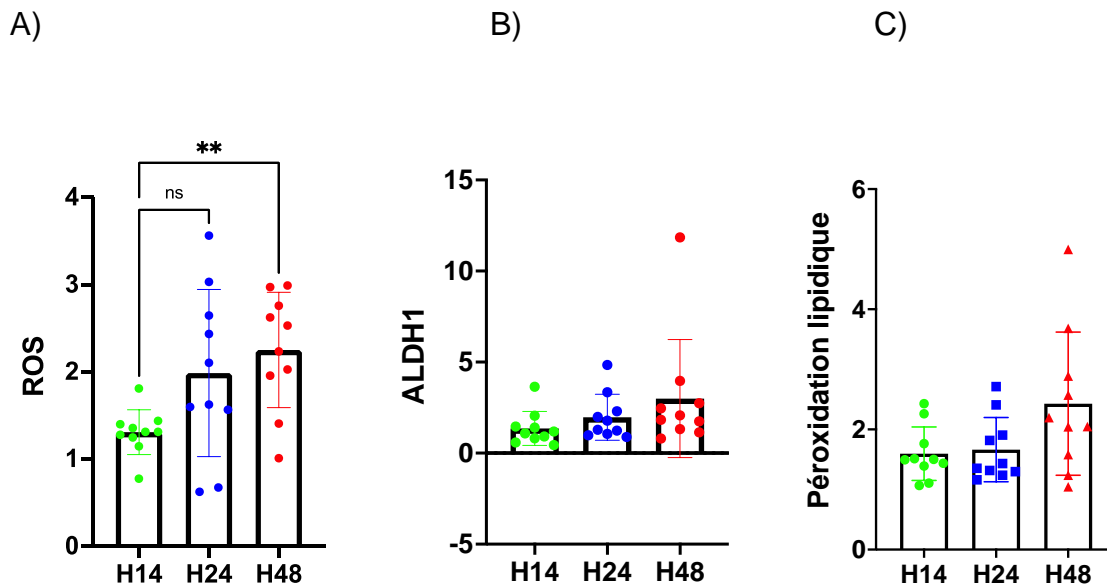


Figure 13 : Evolution des profils redox après incubation par l'ARACYTINE

A) Pourcentage de cellules ROS élevées dans les différentes lignées cellulaires à 14, 24 et 48H après le traitement par l'ARACYTINE. **B)** Pourcentage de cellules ALDH 1 élevées dans les différentes lignées cellulaires à 14, 24 et 48H après le traitement par l'ARACYTINE **C)** Peroxydation lipidique au 3 temps d'incubation avec l'ARACYTINE

Afin d'étudier le mécanisme d'action sous-jacent de la sensibilisation des cellules de LAM au DIMATE par l'ARACYTINE, nous avons évalué le niveau de ROS, l'activité ALDH et la peroxydation lipidique. Nous avons montré que l'ARACYTINE augmente significativement le niveau de ROS après 48h d'exposition à l'ARACYTINE (Fig 5 A ; H14 vs H48 $p= 0,0027$). Nous observons la même tendance mais non significative pour le niveau d'ALDH1 et la peroxydation lipidique.

Nous nous sommes ensuite intéressé par rapport à l'état basal des lignées non traitées.

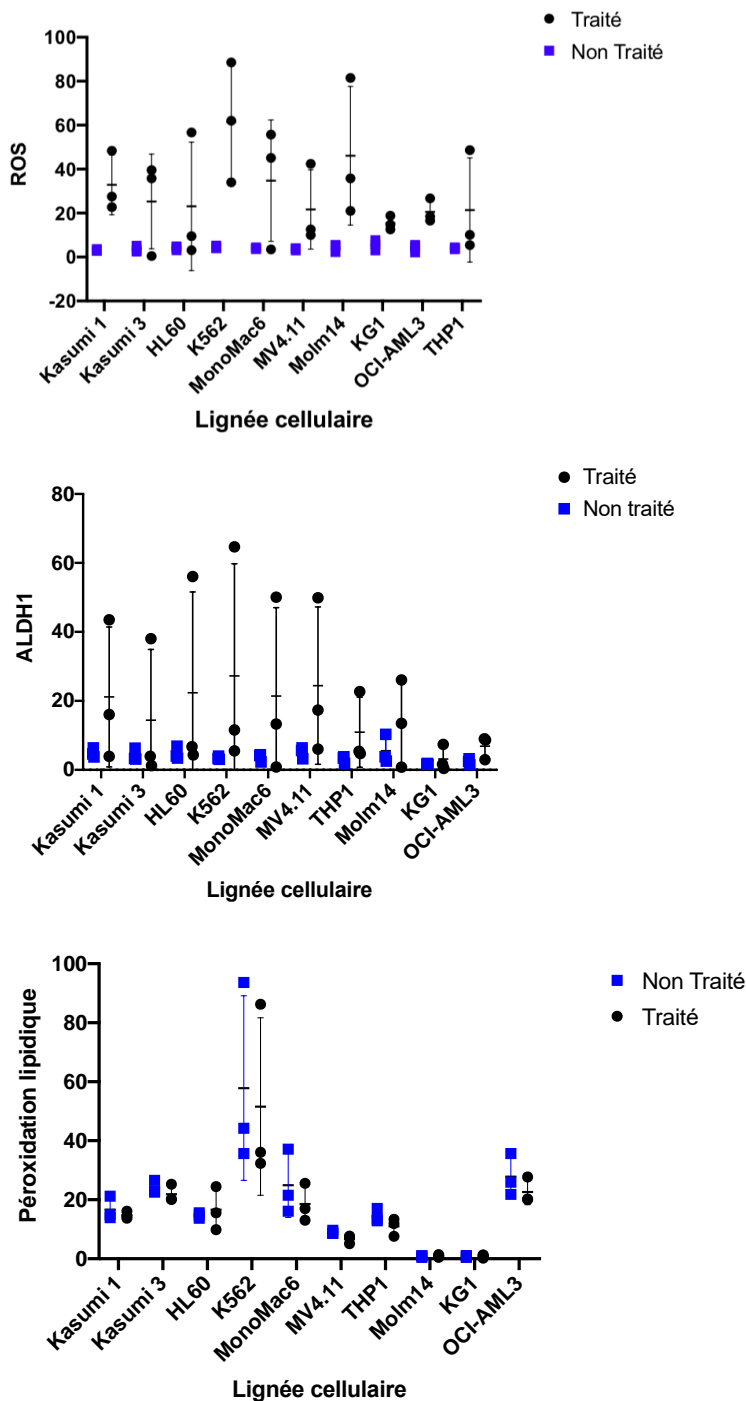


Figure 14 : Evaluation pré et post traitement par AraC dans 10 lignées.

A) Evolution des ROS dans les lignées cellulaires sans traitement et post exposition à l'AraC. **B)** Evolution de l'ALDH1. **C)** Evolution de la peroxydation lipidique

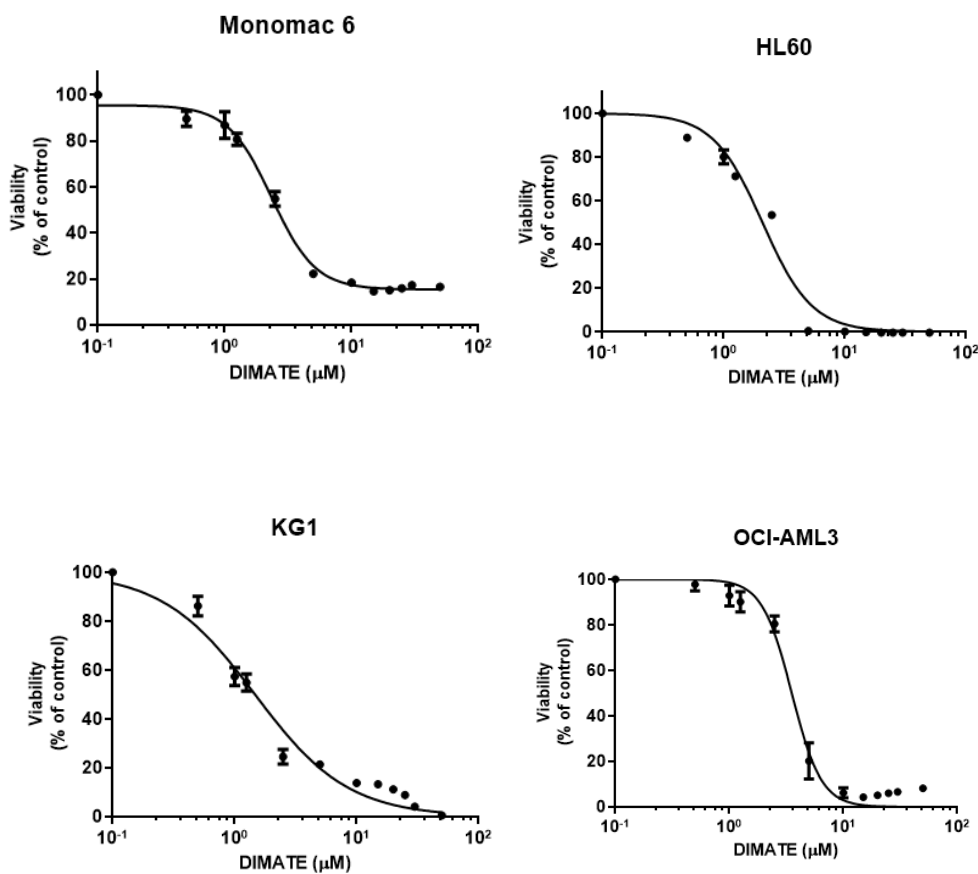
Il existe une différence significative entre le niveau de ROS dans les lignées à l'état basal et après le traitement par ARACYTINE ($p < 0,0001$).

Il en est de même pour l'ALDH 1 ($p = 0,0017$).

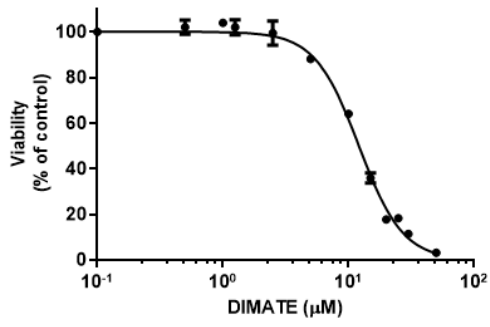
Il existe un changement de l'état d'oxydation dans les cellules tumorales lors du traitement par Aracytine. Dans la plupart des lignées il existe une modification de rapport Reduction/Oxydation. Lorsque l'oxydation augmente le rapport diminue. C'est le cas dans la majorité des lignées sauf HL60, KG1 et Molm 14. ($p = 0,35$) (Figure 14)

3. Vers une étude de Synergie :

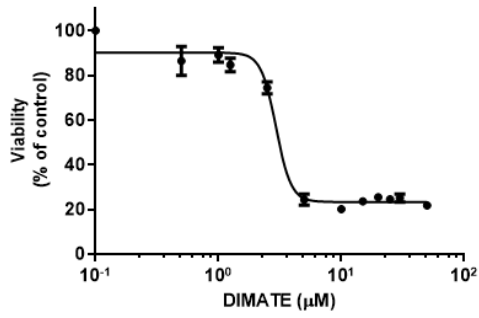
a. Effets du DIMATE sur les lignées cellulaires :



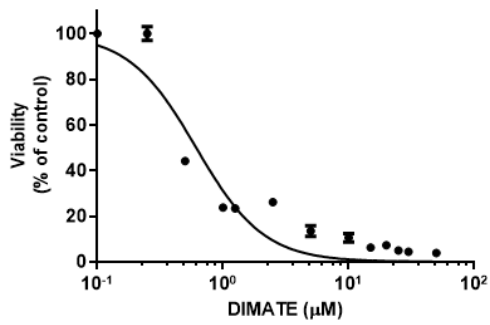
THP1



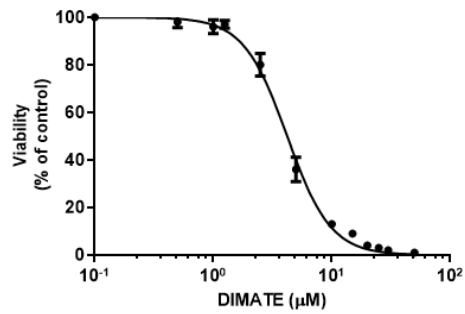
MV4.11



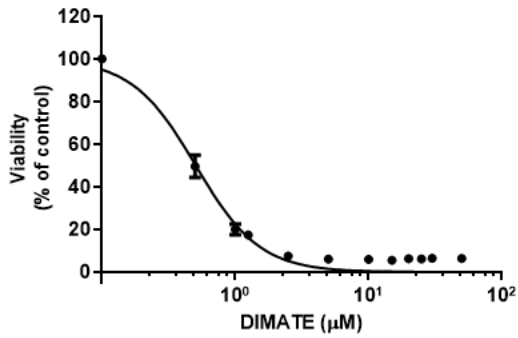
RS4.11



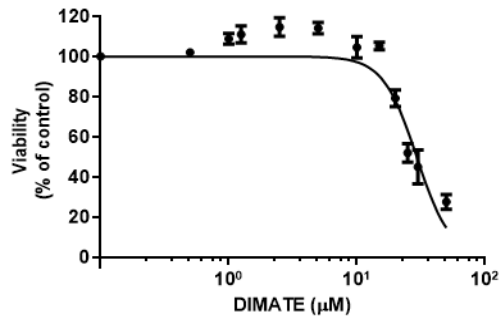
K562



Kasumi 1



Kasumi 3



Molm14

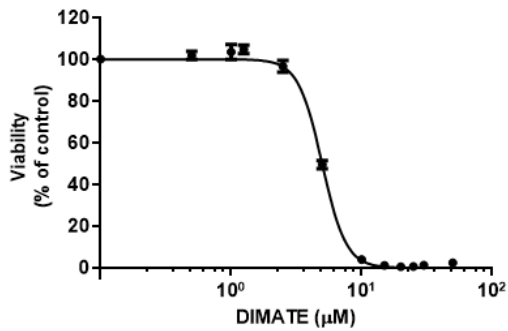


Figure 15 : Viabilité cellulaire des différentes lignées cellulaires en fonction de doses croissantes de DIMATE

Différentes doses de Dimate ont été testées sur les lignées cellulaires et ont permis de d'établir les IC50 pour chacune d'entre elle :

- Monomac 6 = 2.55 μ M
- HL60 = 2.093 μ M
- KG1 = 1.47 μ M
- OCI AML3 = 3.534 μ M
- THP1 = 12.11 μ M
- MV4.11 = 2.947 μ M
- RS4.11 = 0.61 μ M
- K562 = 4.212 μ M
- Kasumi 1 = 0.56 μ M
- Kasumi 3 = 29.39 μ M
- Molm 14 = 4.988 μ M

Au total, si l'on considère la zone thérapeutique au vue de la sensibilité des cellules souches hématopoïétiques, seules 2 lignées cellulaires sont résistantes. Il s'agit des Kasumi 3 et des THP1 avec respectivement une IC 50 à 29,39 et 12,11 μ M. (Figure 15)

Evaluation ex vivo des voies redox comme biomarqueurs prédictifs de l'efficacité du DIMATE et pronostic:

1. Mise au point de Biomarqueurs prédictifs et pronostics :

a. Matériel et méthode :

i. Échantillons de patients :

Des échantillons de sang périphérique et de moelle osseuse de patients atteints de LAM ont été prélevés après le consentement éclairé au diagnostic, en post induction, pendant le suivi ou en cas de rechute. Les tests ROS, ALDH et GSH ont été effectués au laboratoire d'hématologie de l'hôpital universitaire de la Timone. Confère tableau 4 : population générale. Les données de « The Cancer Genome Atlas » (TCGA) ont été utilisées pour l'expression ARN des ALDH1.

Les informations sur l'expression ARN des ALDH1 sur les lignées sont tirées de la base de données « Cancer Cell Line Encyclopedia »(CCLE).

ii. Isolement des cellules CD34+ et culture :

Les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) de patients atteints de LAM ont été isolées par gradient de densité Ficoll-Hystopaque (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, France). Le tri des cellules CD34+ a été effectué avec le CD34 MicroBead Kit UltraPure (MACS ; Miltenyi Biotec, Paris, France). La pureté de la préparation ($\geq 90\%$ de CD34+) a été évaluée par cytométrie de flux. L'échantillon de cellules enrichi en CD34+ a été cultivé en plaque 96 puits pendant 48 h à 6×10^6 cellules/ml en milieu CellGro (CellGenix GmbH, Fribourg, Allemagne) complété par les cytokines rh SCF (100ng/ml), rh TPO (20ng/ml) et rh Flt3 (50ng/ml).

iii. Viabilité cellulaire :

Les cellules enrichies en CD34+ ont étéensemencées dans des plaques de 96 puits à une concentration de 50.000 cellules/puits. Les cellules ont été non traitées ou traitées avec sept concentrations de DIMATE (Advanced BioDesign, Lyon, France), pendant 48 heures à 37°C, 5% de CO₂. La viabilité des cellules a été contrôlée par AlamarBlue (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) sur un lecteur de

microplaques multimode TriStar LB 941 (Berthold Technologies, Thoiry, France). La demi-concentration inhibitrice maximale (IC50) est déterminée par une analyse de régression non linéaire de la lignée cellulaire de la courbe log-dose/réponse.

iv. Essai ALDEFLUOR :

Les activités de ALDH1 et ALDH3 ont été suivies par l'ajout de substrats spécifiques aux deux enzymes dans la solution cellulaire enrichie en CD34+. Le rétinoate et le benzoate ont été utilisés pour contrôler respectivement l'ALDH1 et l'ALDH3, ils ont été utilisés à la concentration finale de 0,5µM. Les CD34+ sont repris dans un milieu RPMI sans rouge de phénol (Gibco, #11835-030) à une concentration de 1.106 cellules/ml et sont incubés 30 minutes à 37°C avec ces substrats, couplés avec du fluorochrome (résorufine-650nm et fluorescéine-530nm).

v. Détection des ROS :

La production de ROS cellulaire a été mesurée à l'aide du marqueur ROS 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) (Merck, #D6883). Les cellules enrichies en CD34+ sont prélevées en RPMI sans milieu au rouge de phénol à une concentration de 1.106 cellules/ml et incubées pendant 30 minutes à 37°C avec du DCFDA à une concentration finale de 2µM. Dans la cellule, le DCFDA est désestérifié en un signal fluorescent lu à 530 nm en cytométrie de flux.

b. Population :

Les différents résultats ci-après sont issus de la population initiale. Les syndrômes myélodysplasiques ne seront pas pris en compte dans les analyses de cette partie.

c. Résultats :

i. ROS et ALDH comme biomarqueur pronostic dans la LAM :

Les échantillons de LAM ont été regroupés en catégorie cytogénétique favorable, intermédiaire et défavorable et analysés en fonction des niveaux d'activité de l'ALDH1A1.

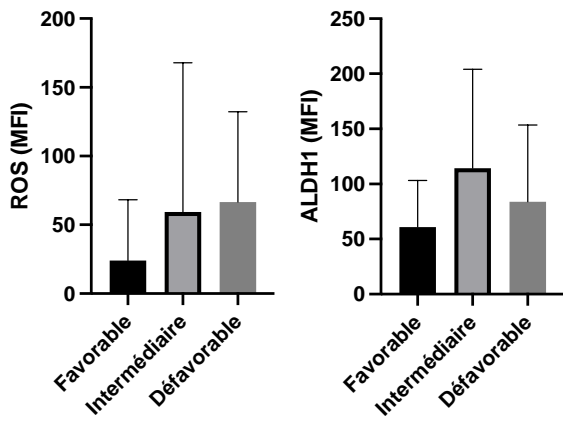
Quand on compare les niveaux de ROS et d'ALDH1 à T0 sur le sang et la moelle en fonction de la classification ELN, on observe dans tous les cas de figures une augmentation de ces 2 paramètres dans les groupes intermédiaire/défavorables par rapport aux patients avec un risque favorable. (Figure 16 A et B)

La cohorte du TCGA regroupe 174 échantillons de LAM permettant d'obtenir des données publiques de RNA seq. L'expression ARN de l'ALDH1 est fortement retrouvée dans les sous groupes intermédiaire et défavorable de l'ELN. L'expression est significativement différente dans le groupe favorable versus le groupe intermédiaire ($p < 0,0001$) et le groupe défavorable ($p < 0,0001$). (Figure 16 C)

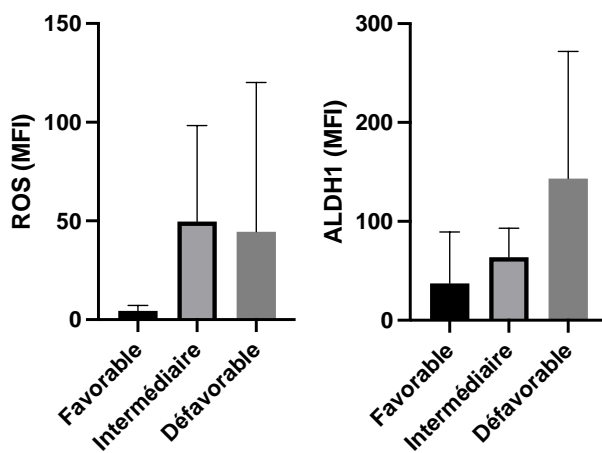
Il existe une tendance à l'augmentation des ROS et des ALDH1 chez les patients réfractaires en comparaison aux patients en rémission complète (RC). Cette tendance est identique que l'échantillon soit d'origine périphérique ou centrale. (Figure 17, A et B).

Après la fin de la chimiothérapie, la détection de faibles niveaux de maladie résiduelle (MRD) est hautement prédictive d'une rechute ultérieure. La détection de faibles niveaux de MRD est difficile dans la LAM, car il peut être difficile de distinguer les cellules de la LAM des cellules hématopoïétiques primitives saines. En outre, en raison de l'hétérogénéité clonale et de l'instabilité génétique de la leucémie, les cellules LAM post-thérapeutiques sont souvent phénotypiquement différentes de la population initiale, ce qui rend leur détection difficile. Chez les patients en rémission complète (RC), nous avons évalué la maladie résiduelle minimale (MRD). Les niveaux de ROS chez les patients MRD+ ($n=6$) sont augmentés par rapport à leur niveau au moment du diagnostic pour un patient donné. La MFI des ROS au moment du diagnostic est à 18,3 (médiane 16,62). La MFI ROS après traitement d'induction et de consolidation pour les patients en rémission cytologique avec une MRD positive est à 72,22 (Médiane 65, 57) ($p < 0,05$). (Fig 17 C)

A)



B)



C)

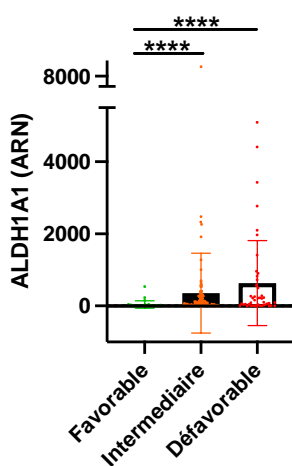
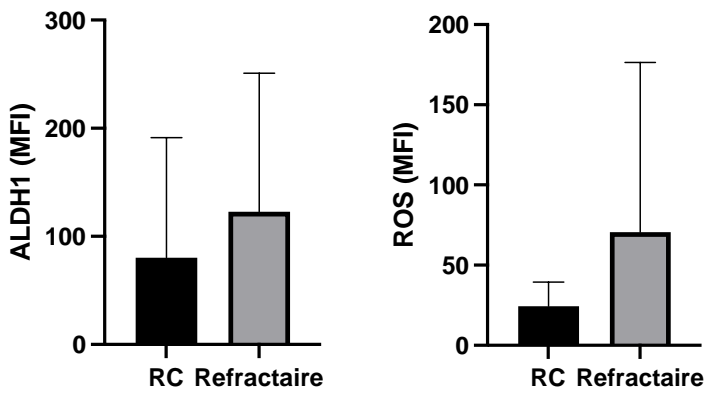
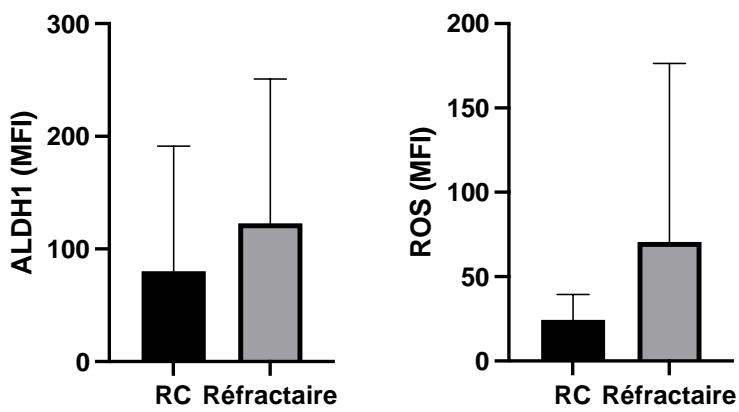


Figure 16 : ELN en fonction des ROS, ALDH dans l'échantillon de patient et sur la cohorte du TCGA A) Evolution des ROS et ALDH1 en fonction de la classification ELN dans le sang B) Evolution des ROS et ALDH1 en fonction de la classification ELN dans la moelle osseuse C) Evolution des ROS et ALDH1 en fonction de la classification ELN dans la cohorte du TCGA

A)



B)



C)

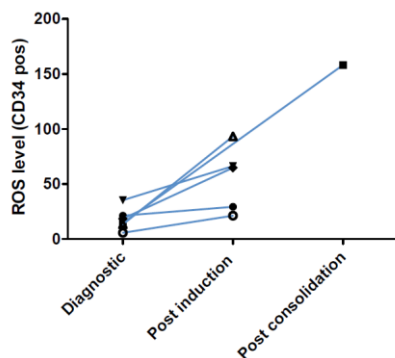


Figure 17 : Evolution du profil redox en fonction de la réponse de la maladie

A) MFI ROS sur sang à T0 (diagnostic) et activité ALDH1 en cytométrie de flux sur sang à T0 B) MFI ROS et activité ALDH1 sur moelle osseuse à T0 C) Evolution du niveau de ROS du diagnostic à la post consolidation chez les patients MRD positifs.

ii. Biomarqueur prédictif de l'efficacité de DIMATE ?

Nous avons tenté d'évaluer si les niveaux de ROS ou d'ALDH1 pouvait être utilisé nouveaux biomarqueurs de la sensibilité au DIMATE. À cette fin, nous avons d'abord déterminé la sensibilité au DIMATE de 10 lignées cellulaires de LAM (figure 18 A,B). Il n'y a pas de corrélation entre l'expression du niveau d'ARN ALDH1 (donnée CCLE) et l'IC50 du DIMATE ; néanmoins, les valeurs extrêmes de l'ARN ALDH1A1 étaient associées à une meilleure sensibilité à DIMATE (IC 50 ; $p=0,038$). Nous avons ensuite évalué l'activité de DIMATE sur les blastes primaires de 14 échantillons de patients atteints de LAM de la cohorte initiale. Ni les ROS ni ALDH1 n'ont été corrélés à l'IC50 de DIMATE. A noter que seul 2 échantillons sont définis comme résistants selon le seuil de 9 μ mol/l de DIMATE, à partir duquel les cellules souches hématopoïétiques normales présentent une toxicité importante.

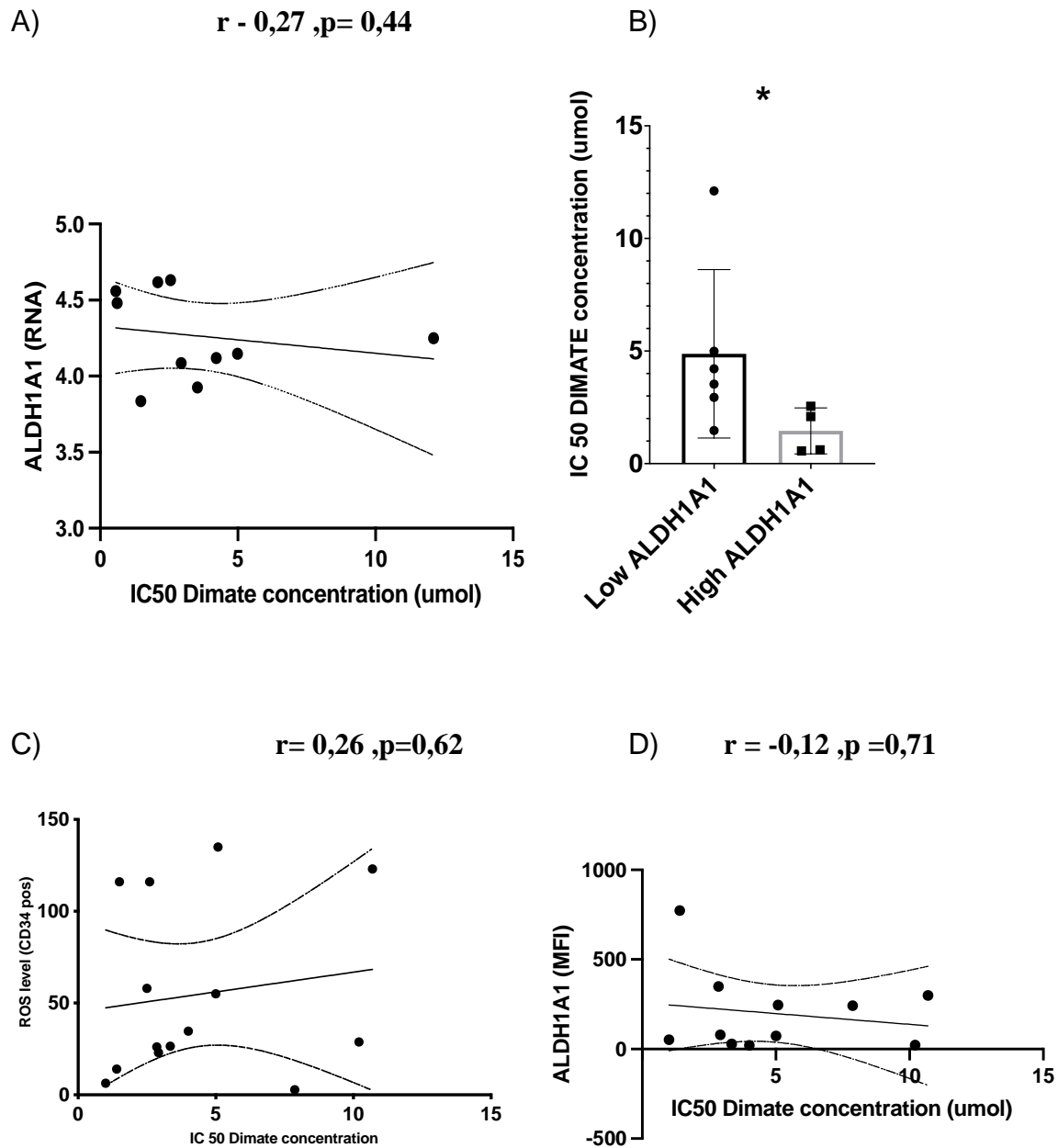


Figure 18 : Corrélation des IC50 du DIMATE en fonction du profil redox

- A)** Correlation ALDH1A1 RNA du CCLE en fonction de l'IC 50 du DIMATE. **B)** IC 50 du DIMATE en fonction des niveaux d'ALDH1 **C)** Corrélation entre taux de ROS phénotypique de patients et l'IC50 du DIMATE **D)** Corrélation IC50 DIMATE en fonction des ALDH1 de patients

iii. Analyse univariée de survie globale :

Nous avons ensuite évalué l'impact du ROS sur la survie globale des 27 patients, de la population principale, atteints de LAM de novo suivis depuis le diagnostic initial (Tableau 5). On observe une séparation des deux cohortes selon leur niveau de ROS. La bifurcation de la cohorte LAM à l'aide de ce seuil de ROS a montré que les patients ayant un niveau de ROS élevé avaient une survie significativement diminuée [HR = 4,28 (95% CI, 1,054-17,41), p=0,006; Fig 19].

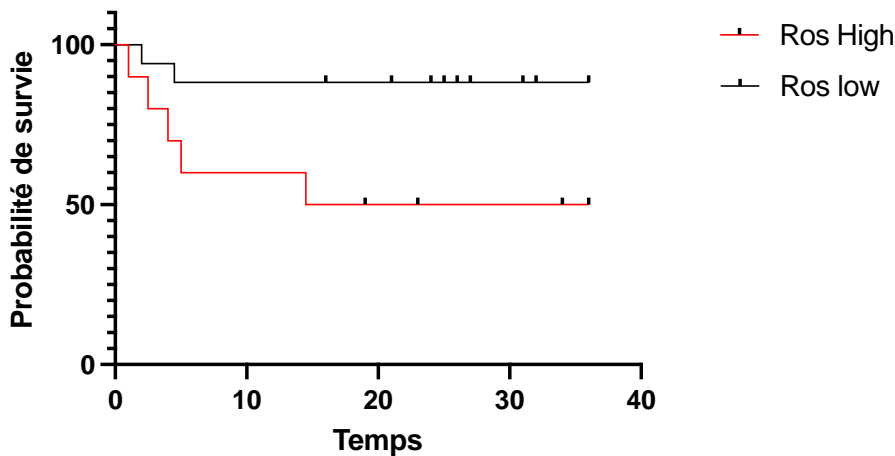


Figure 19 : Courbe de survie. Courbe de survie ROS low et ROS high.

Charasteristic	ROS High (10)	ROS Low (17)	P Value
ELN Classification			
Favorable	1	6	0,2
Intermediate	4	6	0,9
Adverse	5	5	0,41
Sexe			
Men	4	9	0,69
Women	6	8	0,69

Tableau 5 : Caractéristique des patients de l'analyse univariée de survie

La comparaison faites entre les sous groupes ALDH 1 low versus High ne met pas en évidence de différences significatives en terme de survie, qu'il s'agisse des données phénotypiques de notre cohorte ou des données ARN issue du TCGA.

PARTIE III Système immunitaire et potentiel Oxydo-réduction :

I. Introduction :

La réponse immunitaire qu'elle soit adaptative ou innée joue un rôle important dans la défense antitumorale spontanée. Depuis une vingtaine d'année et les débuts des traitements par anticorps monoclonaux, la modulation du système immunitaire fait partie de l'armement de la lutte anticancéreuse. Mais la majorité des approches d'immunothérapie repose sur l'association d'une drogue ET de la réponse du système immunitaire qui en est augmentée et dirigée vers la cible tumorale ; c'est le principe d'action des anticorps monoclonaux dont une grande part de l'efficacité dépend de la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). Des drogues immunomodulatrices (les IMiDs) telles que le lénalidomide, ont démontré une grande efficacité dans de multiples hémopathies, en induisant une prolifération et une activation des cellules NK. Enfin de façon récente le blocage des voies d'inhibition de la réponse immunitaire (anti-PD1/PD-L1 et CTLA4 en particulier) présente des possibilités thérapeutiques intéressantes, notamment dans certaines indications jusqu'à présent peu sensibles aux traitements, tels que le mélanome métastatique par exemple.

Mais les approches d'immunothérapies utilisées en monothérapie donnent rarement des résultats pleinement satisfaisants. Parmi les possibilités d'amélioration d'efficacité, l'association immunothérapie-chimiothérapie est un standard du traitement des lymphomes/LLC (anti-CD20 + chimiothérapie ; R-CHOP, RFC, R-bendamustine), est en passe de le devenir dans le myélome (anti-CD38 + VMP, VRD, VCD etc...), dans les leucémies aiguës lymphoblastiques (anticorps bispécifique : Blinatumomab...), dans les leucémies aiguës myéloïdes (anti-CD52 : Mylotarg) voire dans toutes pathologies (T-CAR cells). Il est donc important d'évaluer les effets des chimiothérapies sur les effecteurs immuns afin, dans la mesure du possible, d'épargner le système immunitaire du patient pour laisser une chance aux approches d'immunomodulation.

Pour ces raisons, nous nous intéresseront aux effets du DIMATE sur le système immunitaire (lymphocytes T et cellules NK en particulier) de sujet sain, sachant que

les patients atteints d'hémopathies (et dans les LAM en particulier) présentent dans la plupart des cas un déficit immunitaire.

II. Système immunitaire et LAM :

1. Contexte scientifique :

Les blastes mettent en place des mécanismes d'échappement au système immunitaires. Les cellules de LAM expriment à la fois les classes I et II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), ce qui les rend sensibles à la reconnaissance et à l'attaque des lymphocytes T. Ils expriment également le complexe immunogène majeur (MIC) -A / B, l'un des ligands du récepteur NKG2D des cellules NK activatrices. Les lymphocytes T et les cellules NK exercent une cytotoxicité via la libération de perforine-granzyme, l'interaction du ligand induisant l'apoptose (TRAIL) avec les récepteurs de mort sur la cible provoquant l'apoptose, et indirectement par la production de cytokines inflammatoires et le facteur de nécrose tumorale (TNF) et l'interferon (IFN).

Les cellules T sont réduites après la chimiothérapie, mais ont un potentiel clonogéniques rapides qui permet une récupération rapide des lymphocytes T²²⁵. Les patients atteignant les plus hauts taux de lymphocytes dans les 6 semaines de chimiothérapie ont les taux de rechute les plus bas²²⁶. La survie à long terme dans la LAM est également favorisée par les numérations lymphocytaires normalisées²²⁷. Ces données suggèrent toutes qu'un système immunitaire intact peut protéger contre la rechute de la maladie, mais ne définissent pas si l'effet est médié par les cellules T ou les cellules NK.

Il y a diverses anomalies dans la LAM au diagnostic et à la rechute qui suggèrent que la leucémie peut se développer malgré l'immunosurveillance et peut acquérir de nouvelles caractéristiques pour échapper au contrôle immunitaire.

Des caractéristiques génétiques émergentes peuvent favoriser le développement de la LAM en présence d'un système immunitaire intact. Il y a une fréquence accrue dans la LAM d'un génotype particulier de la molécule co-stimulatrice CTLA-4. La molécule KIR inhibitrice KIR 2DL2 est exprimée plus fréquemment dans la LAM,

suggérant encore une prédisposition à la LAM par une forme d'échappement immunitaire²²⁸.

Il existe également des preuves solides que les LAM établies peuvent muter pour échapper au contrôle immunitaire. L'exemple le plus frappant provient des études après greffe de cellules souches où les leucémies récidivantes régulent négativement les molécules co-stimulatrices et deviennent résistantes à la lyse médiée par les cellules NK. Après allogreffe haplo-identique, les blastes régulent à la baisse les HLA désappariés pour éviter de puissants effets anti-leucémiques par les lymphocytes T alloréactifs^{229,230}. Les cellules de LAM à la présentation de la maladie montrent un certain nombre d'anomalies suggérant une pression immunitaire pour sélectionner des variants qui échappent à la surveillance immunitaire. La LAM peut exprimer le ligand de la protéine liée au facteur de nécrose tumorale induite par les glucocorticoïdes (GITRL), qui peut bloquer la fonction NK en déclenchant le GITR sur la cellule NK directement ou via la GITRL soluble²³¹. Les blastes de la LAM expriment souvent faiblement des molécules co-stimulatrices qui peuvent favoriser leur évasion de la destruction par les lymphocytes T, et la probabilité de rester en rémission est plus grande chez les patients qui expriment CD80 et CD86²³². Les cellules de LAM peuvent perdre des ligands pour des molécules co-stimulatrices telles que le ligand 4-1BB, ce qui peut permettre à la leucémie de bloquer l'attaque des cellules T par la liaison du ligand soluble à la cellule T²³³. L'auto-peptide de la chaîne invariante associée à la classe II (CLIP) est exprimé de manière variable dans la LAM. La régulation négative du CLIP peut augmenter l'antigénicité des cellules de LAM et augmenter les réponses CD4. Les patients dont les blastes de LAM ont moins de CLIP lié aux molécules HLA-DR ont des rémissions prolongées²³⁴. Les cellules de LAM sécrètent des facteurs solubles qui peuvent être responsables d'une variété de défauts observés dans la fonction des cellules T et NK²³⁵.

Grâce à leur affinité de lignage myéloïde, les cellules de LAM peuvent générer des cellules dendritiques leucémiques (DC) *in vitro* et *in vivo* qui fonctionnent comme des cellules présentatrices d'antigène (APC). Cependant, les LAM DC sont nettement anormaux²³⁶. Ils peuvent inhiber l'induction de CTL, induire l'anergie des lymphocytes T²³⁷ et favoriser la génération de lymphocytes T *régulateurs*²³⁸ qui sont augmentés dans la LAM²³⁹.

Probablement à cause de la leucémie, les lymphocytes T dans la LAM présentent plusieurs anomalies : les émigrants thymiques récents sont réduits, suggérant une fonction thymique défectueuse²⁴⁰. Une étude détaillée des cellules T dans la LAM a retrouvé des cellules T avec des phénotypes et génotypes anormaux qui ont formé des synapses immunitaires défectueuses avec des blastes²⁴¹. Dans les leucémies aiguës myéloïdes, nous avons analysé²⁴² au diagnostic avant tout traitement, les cellules NK. Ces cellules CD3-/CD56+ ont été mises en culture avec de l'IL2 et analysées en cytométrie en flux. Il n'y a pas de différence concernant l'expression de CD16, 2B4, CD94 et NKG2D entre les cellules provenant des patients leucémiques et les cellules des témoins sains. En revanche, il existe un défaut d'expression de NKp30 et NKp46 (phénotype NCR^{Dull}) chez la plupart des patients. Les cellules NK de phénotype NCR^{Dull} présentent une moindre cytotoxicité que celles de phénotype NCR^{bright}. Cependant, les cellules NK provenant des patients leucémiques, quel que soit leur phénotype NCR, sont incapables de lyser les blastes leucémiques autologues, faisant supposer un mécanisme surajouté de défaut d'expression des ligands des NCR chez les patients dont les NK ont un phénotype bright. Le phénotype NCR^{Dull} n'est pas associé à un type particulier de leucémie dans la classification FAB (French American British). Le phénotype NCR^{Dull} est acquis pendant le développement de la leucémie car on observe la réversibilité de ce phénotype après rémission complète. Cette étude met en évidence un mécanisme de type contact cellulaire pour la down-régulation de NKp30 et NKp46 et exclut l'implication du TGF. De plus, il y a une corrélation entre le phénotype NCR^{Dull} et un mauvais pronostic chez les patients atteints de LAM²⁴³. Chez les patients atteints de syndromes myélodysplasiques, le nombre des cellules NK est identique aux témoins sains. De plus, la densité des NCR en surface ne varie pas chez les patients atteints de SMD par rapport aux témoins sains. En revanche, l'activité cytotoxique et sécrétrice des NK est diminuée chez ces patients. De même, les NK des patients atteints de syndromes myélodysplasiques présentent un fort taux d'apoptose en réponse à l'IL2 et un potentiel de prolifération diminué²⁴⁴. Dans une autre étude récente, les auteurs confirment ces données concernant le potentiel cytotoxique des NK des patients atteints de SMD et montrent une corrélation entre des critères de mauvais pronostic : un score IPSS élevé, un excès de blastes, un caryotype anormal et un myélogramme hypercellulaire²⁴⁵. Enfin, le microenvironnement de la LAM peut favoriser la prolifération des blastes : les cellules stromales mésenchymateuses des

leucémies peuvent fournir un milieu immunosuppresseur²⁴⁶ et la région protectrice de la moelle osseuse favorise la survie des cellules souches leucémiques²⁴⁷.

2. Equilibre Red/ox au sein des cellules immunitaires :

a. Cellules immunosuppressives :

i. Les LT regulateurs :

La modulation immunitaire est une stratégie antitumorale prometteuse qui peut être combinée avec succès aux traitements anticancéreux actuels.

L'arsenic a augmenté la réponse immunitaire antitumorale chez les souris CT26 porteuses d'une tumeur du côlon grâce à la modulation des cellules T régulatrices (Treg). L'arsenic a induit une déplétion Treg-sélective in vitro. In vivo, des souris porteuses de tumeurs injecté avec 1 mg/kg d'arsenic a montré une diminution significative du rapport cellules Treg/CD4 et du nombre absolu de Treg par rapport aux témoins.

L'arsenic a exercé des effets antitumoraux uniquement chez les souris immunocompétentes et a renforcé les effets de l'immunothérapie adaptative. L'inhibition de l'appauvrissement des Treg induit par l'As₂O₃ a suggéré qu'elle était médiée par le stress oxydatif.

L'effet différentiel de l'As₂O₃ sur les cellules Treg par rapport aux autres cellules CD4 peut être lié aux différences de statut redox des cellules.

En conclusion, ces résultats montrent que la mort des cellules T reg médié par le stress oxydatif limitent la prolifération tumorale. ²⁴⁸

ii. MDSC

Les cellules suppressives dérivées des myéloïdes (MDSC) sont des populations hétérogènes de cellules myéloïdes immatures dont les fonctions immunosuppressives augmentent chez les individus pendant la progression de la tumeur. Les mécanismes de signalisation de l'activation du MDSC ont été bien étudiés. Cependant, on sait peu de choses sur le l'état métabolique des MDSC et le

rôle physiologique de leur reprogrammation métabolique. Les MDSC ont régulé leurs gènes glycolytiques à la hausse lorsqu'elles ont été confrontées à la tumeur. Les MDSC présentaient un taux de glycolyse plus élevé que les leur pendant cellulaire normal, ce qui a contribué à l'accumulation des MDSC chez les hôtes porteurs de tumeurs. La régulation à la hausse de la glycolyse a empêché la production excessive des ROS par les MDSC, ce qui a protégé les MDSC de l'apoptose. Ils ont identifié un métabolite glycolytique, le phosphoénolpyruvate (PEP), comme un agent antioxydant essentiel capable de prévenir les excès de ROS et a donc contribué à la survie des MDSC. Ces résultats suggèrent que les métabolites glycolytiques ont des rôles importants dans la modulation de l'aptitude des MDSC et pourraient être des cibles potentielles pour la stratégie anti-MDSC. Cibler les MDSC avec les analogues de métabolites glycolytiques spécifiques, par exemple le 2-phosphoglycérate ou le PEP, peut diminuer l'accumulation de MDSC et inverser le milieu immunosuppresseur chez les personnes porteuses de tumeurs²⁴⁹.

b. Cellules de l'immunité acquise :

i. NK

Les oxydants ont un double rôle d'une part dans la régulation des cellules CTL et dans les fonctions NK. Evans et al. 115 ont modélisé la cytotoxicité à médiation immune dans le traitement des cellules du cancer du sein par la combinaison de dommage à la membrane, la formation des pores, le granzyme B et une production d'oxydants accompagnant la mort des cellules cancéreuses. Un mécanisme possible qui sous-tendent l'effet de sensibilisation des lymphocytes cytotoxiques à l'augmentation du niveau oxydant peut être la régulation à la hausse des cellules NK par l'apparition de molécules activatrices à la surface des cellules cancéreuses. Dans les cellules de myélome multiple, des concentrations subtoxiques de melphalan ou de doxorubicine ont induit des DNA Damage response (DDR) et a provoqué la sénescence des cellules ²⁵⁰. Les cellules NK sénescents régulent à la hausse les

ligands des cellules myélomateuses (MICA, MICB et PVR) pour les récepteurs activateurs de cellules NK (NKG2D et DNAM1)²⁵¹

Les oxydants diminuent la capacité des cellules NK à exercer une ADCC contre les cellules tumorales liées aux anticorps. Le traitement avec des inhibiteurs de NOX2 ou d'H₂O₂ ont rétabli l'activité ADCC à médiation cellulaire NK dans des cocultures entre les cellules de CLL, les cellules NK et les monocytes ²⁵²

Cependant, les CL activées peuvent s'adapter à l'environnement de la tumeur soumise à un stress oxydatif, par la régulation de protéines antioxydantes (par exemple, la peroxiredoxine 1 et la thioredoxine 1) comme démontré avec les cellules NK activées par l'IL-2 ²⁵³ De plus, les cellules dendritiques ont démontré qu'elles fournissent des thiols antioxydants lors de la présentation de l'antigène, ce qui rend les cellules cytotoxiques plus résistantes à l'apoptose induite par l'oxydation ²⁵⁴

c. Cellules de l'immunité adaptative :

i. Lymphocyte T :

Les ROS sont essentiels pour l'activation, l'expansion et la fonction effectrice des lymphocytes T ²⁵⁴ Cependant, un taux élevé de production ou d'exposition aux ROS et une neutralisation défectueuse par les systèmes cellulaires antioxydants provoquent un stress oxydatif qui compromet la prolifération et l'activité des lymphocytes T ²⁵⁵ . L'équilibre entre ces deux situations peut être fragile et les études donnent des résultats qui semblent contradictoires

Dans le même ordre d'idées, les CAR-T qui ont une activité catalase étaient protégés contre le stress dû au peroxyde d'hydrogène et ont maintenu une forte activité anti-tumorale, ce qui indique que le peroxyde d'hydrogène contribue à l'anergie des cellules T ²⁵⁶

La sensibilité des lymphocytes T au stress oxydatif varie fortement en fonction du stade de différenciation auquel ils se trouvent.

Les cellules effectrices sont exposées à un environnement peu oxydant, tandis que les cellules mémoires sont des lymphocytes T que l'on trouve dans les environnements les plus oxydants. Certaines cytokines sécrétées peuvent provoquer un stress oxydatif dans les lymphocytes T et dans les cellules cancéreuses. Par exemple, il a été démontré que les macrophages associés aux tumeurs induisent un stress oxydatif subléthal dans les cellules cancéreuses mammaires murines, peut-être

par la sécrétion de TNF- α . D'autre part, les superoxydes dismutases extracellulaires pourraient régler avec précision les niveaux de H₂O₂ dans le milieu extracellulaire, modifiant ainsi la prolifération et la différenciation des cellules immunitaires ²⁵⁷. En fait, les ROS pourraient induire une diminution de la viabilité des lymphocytes T CD4+ et l'inhibition de la synthèse de l'ADN ²⁵⁸

Les Essais in vitro testant la résistance de différents lymphocytes T à l'H₂O₂, il a été démontré qu'il diminue les LT effecteurs, aux lymphocytes T régulateurs, naïfs, et enfin mémoire. Les lymphocytes T effecteurs sont capables de résister des concentrations plus élevées de ROS, ce qui est probablement essentiel pour jouer leur rôle ²⁵⁹. Alors que les Tregs humains ont une teneur en thiol plus élevée, ils sont donc plus résistants à la mort cellulaire induite par l'H₂O₂ sécrétés par les granulocytes que les lymphocytes T conventionnels.

Les Tregs suppriment la synthèse de GSH et la libération de cystéine par les DC via le CTLA-4. La diminution de la GSH intracellulaire qui en résulte entraîne une réduction de la synthèse de l'ADN dans les lymphocytes T ²⁶⁰ Une étude récente a montré que Tregs moduler le métabolisme de la GSH dans les lymphocytes T par contact cellulaire et dépendant de l'antigène ²⁶¹ . Les macrophages suppriment également l'activation des lymphocytes T in vitro et in vivo par les ROS ²⁶² et, des données récentes montrent que les macrophages induisent les Tregs par une voie dépendant des ROS. ²⁶³

De plus, les enzymes qui réduisent le milieu oxydatif intracellulaire influencent la régulation de l'activité des lymphocytes T.

Une étude de De la Fuente et al. révèle que plus l'état oxydatif des cellules et les dommages observés dans les cellules immunitaires de souris âgées ainsi que dans de sang périphérique des personnes âgées. Cependant, chez les personnes centenaires en bonne santé et les chez les souris à très longue durée de vie, dont les fonctions immunitaires sont préservées, elles présentaient une expression réduite de différents symptômes inflammatoires et le stress oxydatif hautement contrôlé dans leur système immunitaire ce qui peut expliquer en partie leur longévité ²⁶⁴

L'inflammation, qu'elle soit aiguë ou chronique, localisée ou systémique, joue un rôle clé dans la différenciation et l'ontogenèse des lymphocytes T. De la formation dans la moelle osseuse jusqu'à l'épuisement ou la sénescence, l'inflammation influence le

développement des lymphocytes T, et à son tour la réponse immunitaire adaptative dans le corps humain. L'homéostasie et la manière dont les lymphocytes T répondent à un antigène spécifique sont influencés par le niveau d'inflammation de l'environnement où se trouvent les lymphocytes T. Tous les changements qui se produisent le long de l'ontogenèse et la différenciation des lymphocytes T nécessitent des adaptations métaboliques et oxydatives. Malgré la profonde influence de l'inflammation sur tous ces processus, on sait peu de choses sur les mécanismes par lesquels il influence les lymphocytes T.

ii. Lymphocyte B :

La régulation par réduction-oxydation (redox) est un mécanisme cellulaire réversible qui modifie la structure 3D et la fonction des protéines de manière " ping-pong ", en passant d'un état inactif à un état actif. Il fonctionne par oxydation des groupes thiol (-SH) des acides aminés de la cystéine. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'oxyde nitrique (NO) et d'autres espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont les seconds messagers de ces cascades de signalisation, y compris le récepteur des cellules B (BCR) ²⁶⁵. L'oxydation des facteurs de transcription par H₂O₂ empêche l'activité de certains (par exemple p53, Jun, Fos) ou stimule l'activité d'autres (par exemple la sous-unité p50 de NF-κB) [2]. Ainsi, les modifications redox sont cruciales dans le contrôle de l'activation des lymphocytes²⁶⁶, de la différenciation et de l'apoptose²⁶⁷.

Le contrôle de l'équilibre redox cellulaire est strict afin d'éviter le stress oxydatif et les dommages cellulaires. Lors de l'exposition à une poussée de ROS endogènes ou exogènes, les cellules lancent une variété de mécanismes de contrebalancement à l'image du système tampon redox du glutathion (GSH). Le principal régulateur redox est le système oxydoréductase et thioredoxine (Trx), un antioxydant composé de Trx, Trx-réductase (TrxR) et NADPH²⁶⁸. La Trx fonctionne selon au moins deux modes, premièrement comme un antioxydant direct, deuxièmement comme un échange thiol-disulfure en s'amarrant efficacement à la protéine cible oxydée, par exemple les domaines des récepteurs ou des disulfures de facteurs de transcription, réduisant ceux-ci 105 fois plus vite que le dithiothréitol (DTT)²⁶⁹. Les facteurs de transcription régulés par Trx dans la lignée des cellules B comprennent la sous-unité p50 de NF-

κ B, qui augmente sa liaison à l'ADN après réduction de Cys62 par Trx ²⁷⁰, AP-1 (Fos, Jun), le récepteur des glucocorticoïdes (GCR), la kinase-1 (ASK-1) signalant l'apoptose, à laquelle Trx est structurellement complexée^{271, 272, 273} et Pax5 [274].

Le système antioxydant intracellulaire est complexe et engage, outre les protéines de la famille Bcl-2, de multiples mécanismes de défense dont les systèmes GSH et Trx sont puissants ^{275,276}. Récemment, il a été montré que Trx favorise la survie des cellules B dérivées de la leucémie lymphocytaire chronique (LLC-B) in vitro, en maintenant un niveau élevé de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, indiquant sa participation dans une voie régulée par le système d'oxydoréduction ²⁷⁷. Bcl-2 n'influence pas la génération de ROS, mais prévient les dommages oxydatifs des constituants cellulaires, y compris les membranes lipidiques ²⁷⁸. Le mécanisme exact par lequel les membres de Bcl-2 assurent la défense antioxydante n'est pas connu, mais les souris knock-out bcl-2 expriment un phénotype correspondant à une exposition à un stress oxydatif chronique, et les cellules surexprimant Bcl-2 sont résistantes à des niveaux élevés d'oxydants ²⁷⁹. Des résultats récents indiquent que Trx induit l'expression de Bcl-2 ²⁸⁰, mais on ne sait pas comment.

Au cours du développement du lymphocyte B, plusieurs étapes de maturation distinctes sont définies. La voie est étroitement régulée par des facteurs de transcription spécifiques aux cellules B, exprimés dans des "fenêtres" de temps et d'espace uniques. Les cellules souches hématopoïétiques se différencient en progéniteurs de lymphocytes B sous l'influence des facteurs de transcription PU.1 et Ikaros. Ces progéniteurs se différencient ensuite en cellules B matures par NF- κ B, Notch-1, E2A, le facteur des cellules B précoces (EBF), et le gène Pax5, Bcl-6, et XBP1 ²⁸¹. Cette expression génique différentielle entraîne des modifications phénotypiques et fonctionnelles définies, notamment le réarrangement séquentiel des gènes d'immunoglobulines et l'expression des récepteurs de surface. Le Pax5 joue un rôle clé dans la progression du développement des lymphocytes B, en particulier aux stades précoce et intermédiaire, mais il est réduit au silence dans les plasmocytes différenciés en phase terminale ²⁸². Pax5e, l'une des quatre isoformes

généérées par l'épissage différentiel, s'est récemment révélée être structurellement complexée à Trx.

Une fois qu'une cellule B a atteint un certain stade de différenciation, la stabilité et la survie à cette étape particulière de la différenciation sont régulées par la machinerie apoptotique du lymphocyte. Le rôle central est joué par la famille de gènes bcl-2, qui comprend les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1, ainsi que les membres protéiques "promoteurs de mort" Bax, Bcl-xs, Bag et Bad²⁸³. Les espèces réactives de l'oxygène régulent le rapport entre les protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques, qui à son tour détermine la survie ou la mort des cellules²⁸⁴.

III. Principaux résultats expérimentaux :

I. Matériels et méthodes

Les cellules étudiées et les méthodes utilisées sont résumées dans le tableau 4.

a. Échantillons de sang humain

Des échantillons de sang d'adultes volontaire sain ont été fournis par l'Etablissement Français du Sang. Les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) ont été prélevées par aphérèse fraîche et ont été isolées du sang par centrifugation par gradient de densité Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich/Merck, #10771).

b. Viabilité des PBMC

Des PBMC sains ont étéensemencés dans une plaque de 96 puits (Greiner bio-on, #665090) à des concentrations de $2,10^5$ cellules/puits, dans le RPMI-1640 GlutaMAX (Gibco, #61870-10) complété par 20% de sérum bovin foetal (FBS) decomplémenté par la chaleur (Gibco, #10270-106) et 30U/ml Il-2 IS (Miltenyi Biotec, #130-097-748). Sept concentrations de DIMATE (Advanced BioDesign, Lyon, France) ont été testées de 1 à 20 μ M. Les PBMC ont été incubées 48 heures avec DIMATE dans une

atmosphère à 37°C, 5% de CO₂. La viabilité des cellules a été mesurée par le protocole de viabilité cellulaire AlamarBlue, sur un lecteur de microplaques multimode Tristar LB 941. La sensibilité au médicament a été quantifiée par la concentration inhibitrice maximale (CI₅₀) pour chaque échantillon de donneur et déterminée par une analyse de régression non linéaire de la courbe log-dose/réponse.

c. Prolifération et activation des lymphocytes T

Les PBMC frais ont été mis en suspension dans un milieu supplémenté jusqu'à une concentration finale de 1,10⁶ cellules/ml. Des billes activateurs des LT humain Dynabeads CD3/CD28 (Life technologies, #11131D) a été utilisé pour activer les lymphocytes T à un ratio de 1:1. Les PBMC ont été platées à 1.10⁶ cellules/ml dans une plaque de 24 puits et ont été non traitées ou traitées avec 2µl de Dynabeads seulement, ou avec 2µl de Dynabeads ajoutés avec 10µM de solution DIMATE. Les PBMC ont été incubées à 37°C et ont été comptées tous les 2 jours pendant 15 jours.

Pour évaluer la production d'IL-2 à partir des lymphocytes T, les PBMC ont été plaquées dans une plaque de 96 puits, en milieu complet sans IL-2 SI. Trois conditions ont été comparées : PBMC en présence ou en absence de Dynabeads et Dynabeads ajoutés avec DIMATE 10µM. Les PBMC ont été incubées dans un incubateur de CO₂ humidifié à 37°C pendant une période de 48 heures. Une aliquot du surnageant de cellules T activées a été recueillie et cryopréservée à -80°C. Les surnageants décongelés ont été évalués pour la production d'IL-2 par ELISA humain IL-2 non enrobé selon les instructions du fabricant (Invitrogen, # 88-7025). L'absorbance correspondant à la sécrétion d'IL-2 a été lue à 450 nm sur un lecteur de microplaques multimode Tristar LB 941. La quantité d'IL-2 a été déterminée par comparaison avec une courbe standard préparée à partir de l'étalon d'IL-2 fourni par le fabricant.

d. Cellules cibles

K562 (DSMZ, #ACC10), une lignée cellulaire de leucémie myélogène chronique humaine a été utilisée pour le test de lyse des cellules NK. La culture en phase logarithmique de K562 a été maintenue dans du RPMI-1640 GlutaMAX supplémenté avec 10% de FBS à 5.10⁵ cellules/ml. Les K562 ont été lavées et remises en suspension dans du RPMI sans rouge de phénol (Gibco, #11835-030) à une concentration de 1.10⁶ cellules/ml et marquées en ajoutant 5µl de 1mM de 3,3'-Diocadecyloxacarbocyanine perchlorate (DIOC) par ml de cellules. K562 ont été incubés à 37°C dans un incubateur au CO₂ à 5% pendant 10 minutes, lavés deux fois en IPR sans rouge de phénol et remis en suspension jusqu'à une concentration finale de 1.10⁶ cellules/ml en IPR sans rouge phénol. Dans l'essai de cytotoxicité sur cellules NK, 10 000 K562 marqués avec DIOC ont été ajoutés.

e. Essai d'activité des cellules NK

Des PBMC fraîches et saines ont d'abord été cultivées pendant six jours dans une plaque à 6 puits à 2 10⁶ cellules/ml, dans un milieu RPMI GlutaMAX complété. Les PBMC ont ensuite été prétraitées avec 5µM et 10µM de DIMATE pendant 6h dans un incubateur à 37°C à une concentration de 2.10⁶ cellules/ml en milieu complété, dans une plaque à 12 puits. Après incubation, les PBMC ont été lavées et remises en suspension dans le milieu supplémenté jusqu'à une concentration finale de 2.10⁶ cellules/ml. Les cellules effectrices (cellules NK) et 10 000 cellules cibles marquées ont été placées dans une plaque de 96 puits pour créer sept rapports effecteurs/cibles (E:T) de 10:1, 5:1, 2,5:1, 1:1, 0,5:1, 0,3:1, 0,2:1. Les PBMC contenant des cellules NK et K562-DIOC ont été co-cultivés pendant la nuit dans un milieu enrichi. Après 18h, 3µl de solution d'iodure de propidium (PI) à 1mg/ml ont été ajoutés à chaque tube avant l'acquisition par cytométrie de flux (LSRII, Becton Dickinson Bioscience). Un total de 1000 éléments marqués DIOC ont été acquis. Les données ont été analysées avec le logiciel d'analyse Kaluza v1.5a (Beckman Coulter).

Les contrôles comportait en PBMC, des K562 marquées uniquement par le DIOC pour obtenir une lyse spontanée et un tube contenant des cellules effectrices avec PI ajouté avec DIOC K562 en même temps que l'analyse.

Le pourcentage de lyse spécifique a été calculé comme suit : $[\text{cellules positives pour DIOC et PI} / \text{cellules totales marquées DIOC}] \times 100 - \text{lyse spontanée}$.

f. Rupture oxydative des leucocytes :

Pour étudier la réponse phagocytaire des neutrophiles et des monocytes à la production de ROS, 100µl d'échantillons de sang frais ont d'abord été non traités ou prétraités avec 5 ou 10µM de solution DIMATE pendant 5 heures dans un incubateur à 37°C. Sans étape de lavage, l'éclatement oxydatif a été directement détecté avec le kit PHAGOBURSTTM (Glycotope Biotechnology, version 05/12), conformément aux instructions du fabricant. En bref, la bactérie E. coli opsonisée et le substrat fluorogène dihydrorhodamine 123 (DHR) ont été ajoutés aux échantillons de sang. Lors de l'oxydation, la DHR est convertie en rhodamine 123 qui est fluorescente (FITC) lorsqu'elle est émise par un laser de 488 nm. L'intensité moyenne de la fluorescence a déterminé les capacités phagocytaires des leucocytes.

g. Analyse statistique

Les valeurs pour évaluer les critères de la fonction cellulaire ont été exprimées en moyenne \pm valeur moyenne de l'erreur standard (s.e.m). Pour déterminer la différence entre les cellules traitées et les cellules non traitées, nous avons utilisé le test Anova puis Bonferroni pour les analyses multiples. $P < 0,05$ a été considéré comme statistiquement significatif.

II. Résultats :

a. IC50 de DIMATE sur les PBMC sains

L'IC50 de DIMATE a été déterminée dans des PBMC sains, avec une concentration de 200 000 cellules par puits, soit 2,106 cellules/ml, ce qui correspond à une concentration cellulaire physiologique dans le sang. La CI50 a été calculée en utilisant le signal non traité (NT) après une prolifération de 48 heures, et était de 16,65 μM (n=11) (Fig 20a). La prolifération a été calculée en utilisant le signal NT à H0. Le blocage complet de la prolifération à 48H a été atteint en utilisant une concentration DIMATE de 21,35 μM (n=7) (Fig 20b). Il est à noter qu'à la concentration de 2,8 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ qui correspond à la CI50 pour la LSC, une viabilité de plus de 75% a été observée avec une très faible inhibition de la prolifération. Ces premiers résultats indiquent que DIMATE n'est pas toxique pour les PBMC humaines à faibles doses.

b. Évaluation de l'impact de DIMATE sur la fonction des cellules T

Dans les PBMC non traitées (n=8), les cellules T ont proliféré après stimulation avec des anti-CD3/CD28 jusqu'à une multiplication par 5 pendant 15 jours (360 heures). Après l'ajout de DIMATE 10 μM , la prolifération des cellules T a eu tendance à être ralentie mais a atteint le même nombre de fois après 15 jours de culture (Fig 21a). En parallèle, la production d'IL-2 après 48 heures de traitement était plus faible que celle des cellules non traitées, mais les résultats n'étaient pas significatifs ($p > 0,05$, Fig 21b). Les résultats suggèrent que DIMATE, à une concentration capable d'éradiquer près de 100% des CSL, n'a pas d'impact significatif sur la prolifération des cellules T et la sécrétion d'IL-2.

c. L'effet de DIMATE sur l'activité des cellules NK saines

Les cellules tueuses naturelles sont connues pour être la première ligne de défense contre les infections bactériennes et virales, mais aussi pour la surveillance immunitaire des cellules malignes. Nous avons évalué ici l'activité de cytotoxicité des cellules NK dans un test de co-culture contenant des PBMC avec comme cellules cibles des CMH de classe I marquées DIOC négatif K562. La lyse spontanée de

K562 marqué DIOC a été déterminée pendant la culture en phase logarithmique par des cellules K562 DIOC et PI positives. L'activité des cellules NK a été significativement réduite ($p < 0,05$) avec un prétraitement avec DIMATE 10 μ M par rapport aux CMB non traitées, en particulier avec un rapport de 1:1 et 0,5:1. Dans d'autres conditions, seule une tendance à la diminution de la cytotoxicité des cellules NK a été observée, sans atteindre une signification statistique (Fig. 22). Il convient de noter que la DIMATE 5 μ mol.L⁻¹ est supérieure à la CI50 pour les CSL (2,8 μ mol.L⁻¹) et qu'elle n'entraîne pas d'inhibition statistiquement significative de la lyse des cellules NK, ce qui suggère que cette concentration ne devrait pas inhiber la réponse immunitaire des NK.

d. Évaluation de l'effet de DIMATE sur le burst oxydatif des granulocytes

Comme les neutrophiles et les monocytes sont impliqués dans les défenses de l'hôte et dans l'élimination des pathogènes, et qu'ils peuvent participer à l'ADCC, nous avons testé l'effet de l'inhibiteur de l'ALDH sur leurs capacités de production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Nous avons observé que la production de ROS par les granulocytes n'a pas changé avec le traitement DIMATE 5 ou 10 μ M par rapport au contrôle non traité (fig 23, $p > 0,05$).

Figures :

Tested cells	Tissue	Stimulation	Incubation / DIMATE treatment	Method	Readout
PBMCs	PBMCs	30U/ml IL-2 SI	48h	fluorescence	Viability/ IC50
T cell function	PBMCs	30U/ml IL-2 SI + anti CD3/antiCD28	15 days 6h	Count/PI ELISA test	Proliferation IL-2 secretion
NK cells activity	PBMCs	30U/ml IL-2 SI	6h	Flow cytometry	DiO-K562 lysis
Neutrophils oxidative burst	Whole blood	Opsionized bacterias	5h	Flow cytometry	ROS production

Tableau 6: Résumé des types cellulaires et de la méthodologie

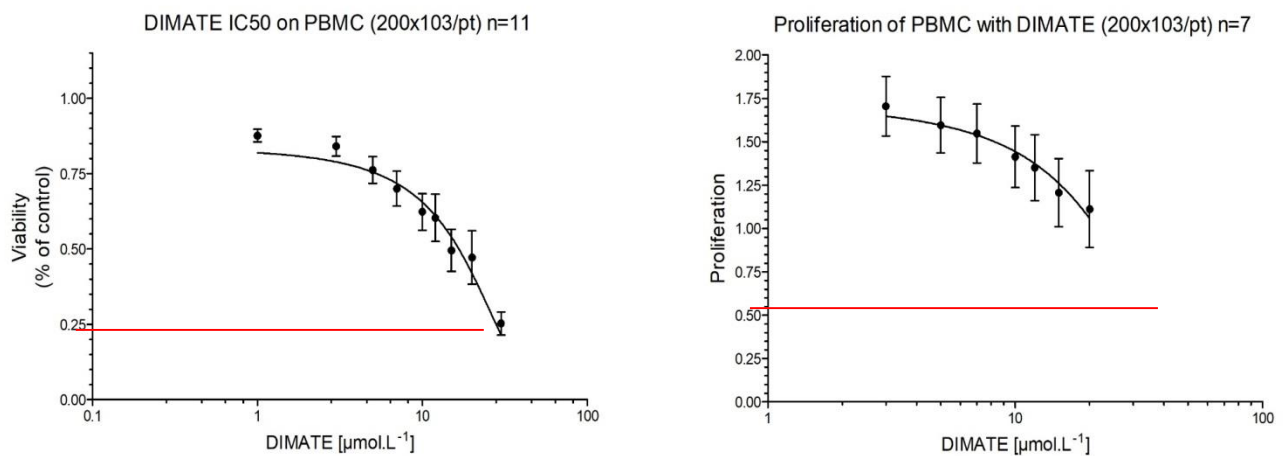


Figure 20 : Effet du DIMATE sur la viabilité (Panel a) et la prolifération (Panel b) des cellules mononuclées du sang périphérique

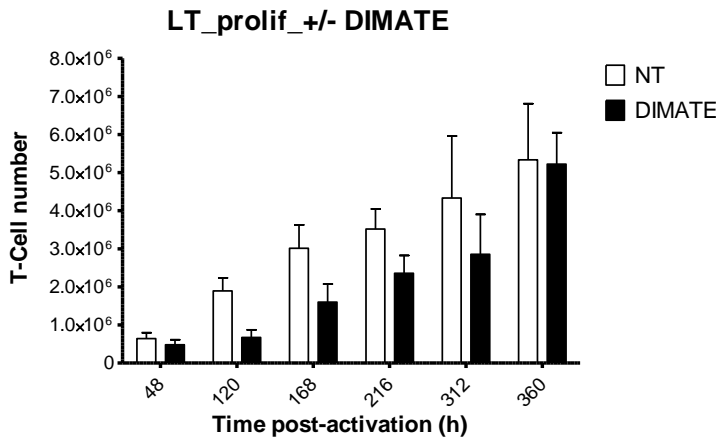
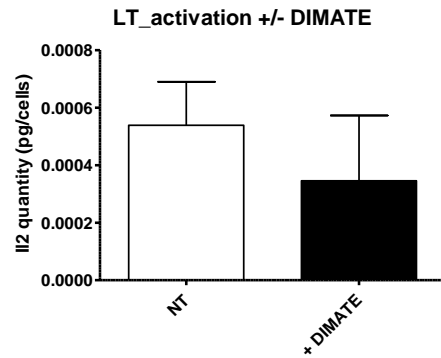
a**b**

Figure 21 : Effet du DIMATE sur la prolifération des lymphocytes T (Panel a) et sur la secretion d'IL-2 (Panel b).

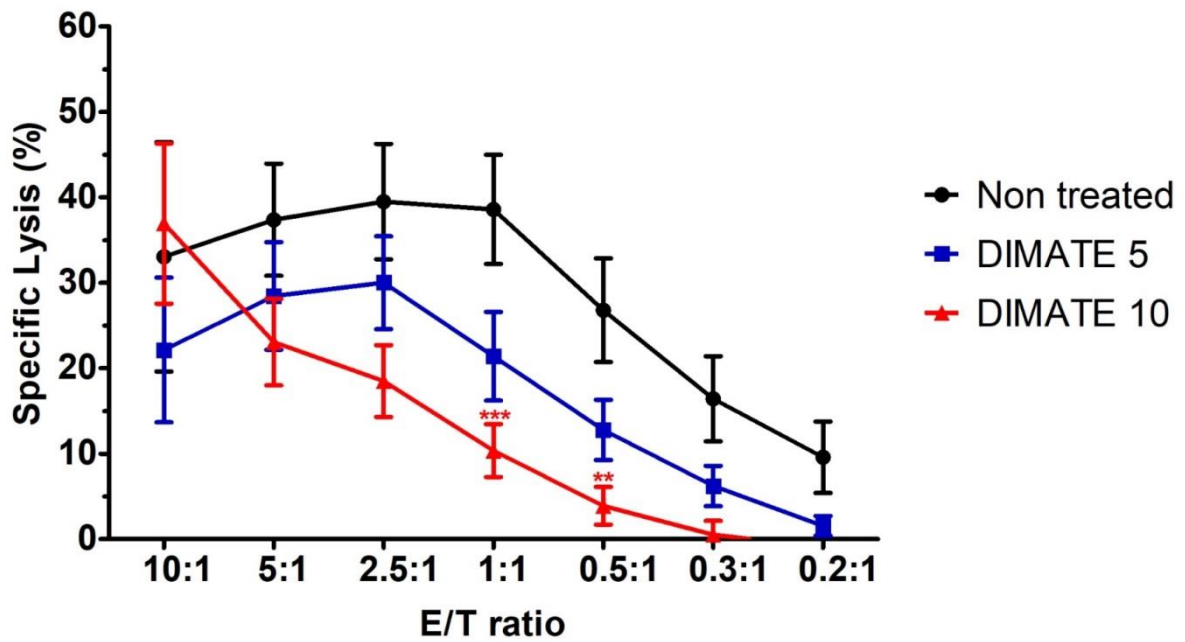


Figure 22 : Effet du DIMATE sur la fonction lyse des NK.

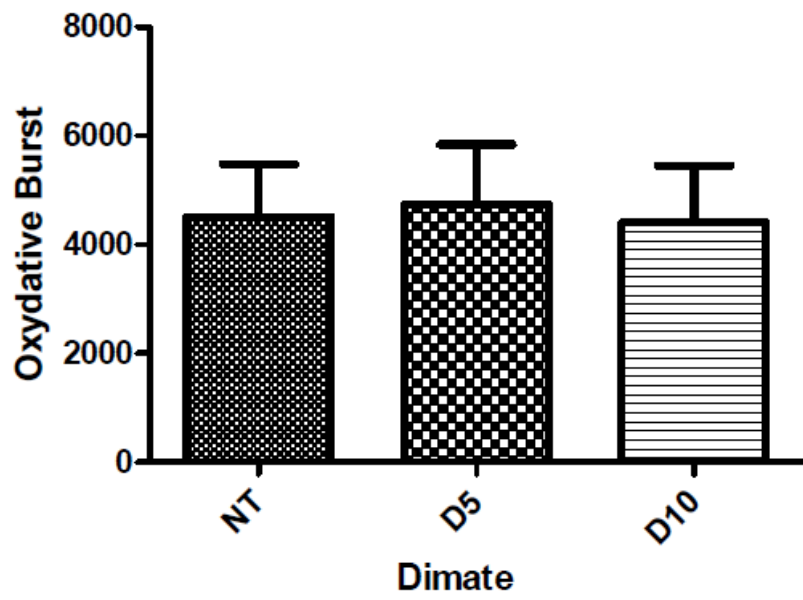


Figure 23: Effet du DIMATE sur la capacité oxydative des neutrophiles.

PARTIE IV: Essai de phase I du DIMATE dans les leucémies aiguës / promotion AdvancedBioDesign

I. Méthodologie :

1. Définitions :

Combinaison de cohortes d'augmentation de dose unique et multiple intra-patient comprenant trois patients par cohorte en fonction de l'occurrence de la toxicité limitante de dose (DLT) et de l'évaluation de la dose maximale tolérée (MTD).

- 3 parties différentes :

Partie A : Dose unique croissante (6 cohortes)

Partie B : Dose multiple ascendante, " Optimisation du régime " (3 cohortes)

Partie C : Dose recommandée pour la phase II, " RP2D " (1 cohorte)

a. Grade CTCAE :

- MILD adverse event L
SEP
- 2 MODERATE adverse event L
SEP
- 3 SEVERE adverse event L
SEP
- 4 LIFE-THREATENING consequences; urgent intervention indicated L
SEP
- 5 DEATH RELATED TO adverse event L
SEP

b. MTD : Dose maximale tolérée

Il équivaut à la dose la plus élevée auquel $\leq 33\%$ des patients ont subi un DLT (définition américaine)

c. RP2D : Dose recommandée pour la phase 2

Mise au point de la dose spécifique, après évaluation de la sécurité, y compris les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, pour tous les patients inscrits. La dose recommandée pour les essais de phase II est traditionnellement définie comme le niveau de dose juste en dessous du niveau de dose toxique, mais peut varier en fonction de l'évaluation de la sécurité et de la PK/PD.

d. Processus 3+3 :

Si aucun des trois patients n'a subi de toxicité limitante (DLT), trois autres patients seront traités à la dose supérieure suivante. Toutefois, si l'un des trois premiers patients présente une toxicité limitant la dose, trois autres patients seront traités au même niveau de dose. L'augmentation de la dose se poursuit jusqu'à ce qu'au moins deux patients d'une cohorte de trois à six patients présentent des toxicités limitant la dose.

e. Dose de toxicité limitante :

Pour la partie B, si deux ou trois patients de la même cohorte ont subi une DLT après la dose 1, semaine 1, la cohorte sera arrêtée et la dose sera définie comme la DLT (c'est-à-dire qu'il ne sera pas nécessaire de recruter 3 nouveaux patients à la dose n-1)

AE ou SAE ne seront pas considérés comme des DLT si le ou les patients se rétablissent, selon le jugement de l'investigateur et dans des délais définis, un état clinique compatible avec la poursuite de l'étude (pour hématologiques) ou récupérer un grade CTCAE ≤ 1 (pour les EI non hématologiques).

Toutes les DLT doivent représenter un changement cliniquement significatif par rapport au niveau de référence. Ainsi, les effets cliniquement importants ou les toxicités persistantes qui ne sont pas incluses dans les critères de gravité peuvent être considérées comme une DLT à la suite de l'examen par le comité de surveillance.

Tous les patients ayant subi un DLT seront retirés de l'étude

2. Dose toxicité limitante hématologique et non hématologique

a. Sur le plan hématologique :

Tout grade CTCAE \geq 3

Il s'agit d'un défaut d'obtention d'une numération de neutrophiles supérieure à 1 000/uL et/ou un taux plaquettaire de plus de 25 000 uL indépendamment de la transfusion de plaquettes le jour \geq 42 après le début du traitement, avec une moelle osseuse hypocellulaire ($<10\%$ de cellules de la moelle) et l'absence de cellules leucémiques persistantes (c'est-à-dire $<5\%$ de blastes de la moelle) mesurée à la fin du cycle (environ le 28-32^e jour)

Remarque : si un sujet présentant des cytopénies persistantes ne présente pas d'hypoplasie de la moelle osseuse à la biopsie (ou par aspiration de la moelle osseuse) ou présente des cellules leucémiques persistantes, ce sujet ne sera pas considéré comme ayant démontré une toxicité hématologique et pourra continuer à recevoir le produit de recherche au moment prévu pour le cycle suivant.

b. Sur le plan non Hématologique :

- Syndrome de lyse ≥ 3 .
- Grade ≥ 3 réaction à la perfusion, et réaction allergique qui diminue au Grade ≤ 1 dans les 72 heures avec une thérapie de soutien appropriée.
- Grade ≥ 3 nausées ou vomissements qui se résolvent au Grade ≤ 1 dans les 72 heures.
- Diarrhée de grade ≥ 3 qui se résorbe au grade ≤ 1 dans les 72 heures.
- Grade ≥ 3 fatigue, asthénie, ou autre symptôme constitutionnel qui se résorbe au Grade ≤ 1 dans les 7 jours.
- Infection de grade ≥ 3 , fièvre (y compris neutropénie fébrile), anomalies électrolytiques et élévation ALT/AST qui revient au grade ≤ 1 ou à la ligne de base dans les 7 jours.
- Retard de plus de 7 jours pour recevoir la prochaine dose prévue en raison d'un effet indésirable persistant lié au médicament.

II. Organisation de l'essai clinique :

1. Partie A : Dose unique croissante

Objectif : définir le régime de traitement pour la partie B.

Une première cohorte de 3 patients recevra une dose unique et fixe de perfusion intraveineuse de 4 heures de ABD- 3001. Suivi de sécurité : 1 semaine.

Si aucune DLT n'est observé au cours du premier cycle, une cohorte de 3 nouveaux patients recevra le prochain niveau de dose.

Si 1 DLT se produit à un niveau de dose donnée, le patient avec la DLT sera retiré et une cohorte de 3 nouveaux patients recevra l'ABD-3001, au même niveau de dose :

- Si < 2 patients sur 6 ont développé une DLT, l'augmentation de la dose se poursuivra avec une cohorte de 3 nouveaux patients
- Si ≥ 2 patients sur 6 ont développé une DLT, l'augmentation de la dose à un niveau supérieur sera arrêtée (la dose est définie comme la DMT)

Si 2 DLT se produisent à la dose 1 : la dose 1 sera divisée par 2, donnée au patient non DLT et à 2 nouveaux patients supplémentaires.

- Si aucune DLT, passer à la dose supérieure suivante (c'est-à-dire la dose 1).
- Si une nouvelle DLT, la cohorte s'arrête.

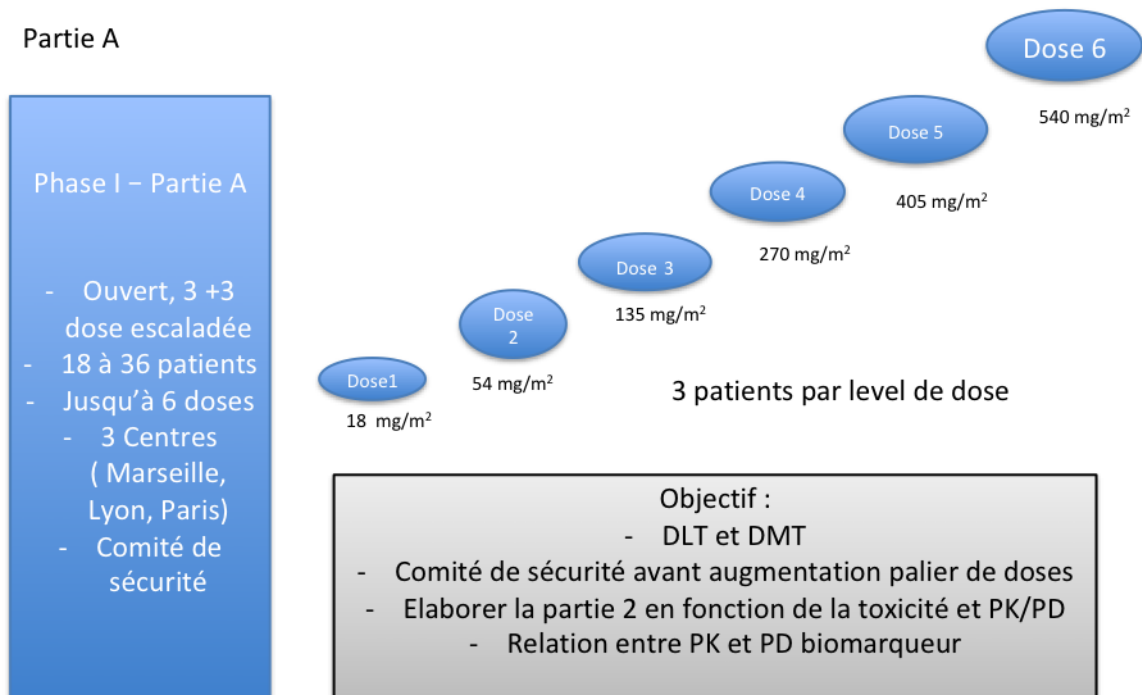


Figure 24 : Partie A essai de phase 1

2. Partie B :Doses multiples croissantes.

Objectif : définir le régime de traitement MTD et RP2D

Une cohorte de 3 patients recevra une dose fixe de perfusion intraveineuse de 4 heures de ABD-3001, 3 fois par semaine, pendant 1 semaine. 3 doses croissantes seront utilisées pour la partie B avec un régime x1,5 entre la dose 1 et 2 et x1,5 entre les doses 2 et 3.

Objectif : passer à une prolongation du traitement de 3 semaines (4 semaines au total)

En l'absence de DLT à la fin de la première semaine de traitement, le traitement est prolongé de 3 semaines supplémentaires

Si 1 DLT apparaît : les patients non DLT continuent. Le traitement du patient présentant un AE de "risque DLT" est retardé. Si la DLT est confirmée, le patient DLT est retiré et 3 autres patients sont recrutés à la même dose. Si la DLT n'est pas confirmée, le patient continue à suivre le programme de prolongation du traitement de 3 semaines. Si une nouvelle DLT est confirmée, la cohorte est stoppée.

Si 2 DLTs apparaissent : la dose 1 sera divisée par 2, donnée au patient non DLT et à 2 nouveaux patients supplémentaires. Si nous n'observons pas de DLT, passer au schéma thérapeutique de 3 semaines, en continuant à la dose 1 divisée par 2. Si nouvelle DLT confirmée, la cohorte s'arrête.

Si 2 DLT surviennent après la semaine 1, dose 1 dans la même cohorte : la cohorte s'arrête.

En l'absence de DLT, le(s) patient(s) continue(nt) à recevoir les perfusions comme prévu.

Si 1 DLT :

- Les patients non DLT continuent
- Le traitement d'un patient atteint d'une EA de "DLTRisk" est retardé (plus de 7 jours). Si le patient récupère dans les 7 jours un état clinique compatible avec la poursuite de l'étude, les perfusions reprennent pour le patient. Si aucune guérison (c'est-à-dire DLT confirmé), le patient sera retiré de l'étude et 3 nouveaux patients commenceront un nouveau cycle à W1, à la même dose (l'objectif est de faire en sorte que 3 patients reçoivent au moins 75 % de leur traitement au cours d'un cycle complet (par exemple, 9 perfusions sur 12 en cas d'ITT))

Si 2 DLT surviennent après la semaine 1, dose 1 dans la même cohorte : la cohorte est stoppée (la dose sera la DMT de la MAD). Si aucune DMT n'est survenue à la fin des 4 semaines de traitement pour la dose 1, 2, 3, une cohorte de 3 nouveaux patients recevront la dose suivante, plus élevée.

Si aucune DMT n'est définie à la semaine 4 de la toute dernière perfusion (par exemple, la dose) :

- Commencer la RP2D à la dose 3, à la même fréquence, ou commencer la RP2D à la dose 3, à une fréquence plus élevée.

Suivi de la sécurité : 4 semaines après la dernière perfusion (c'est-à-dire jusqu'à D56)

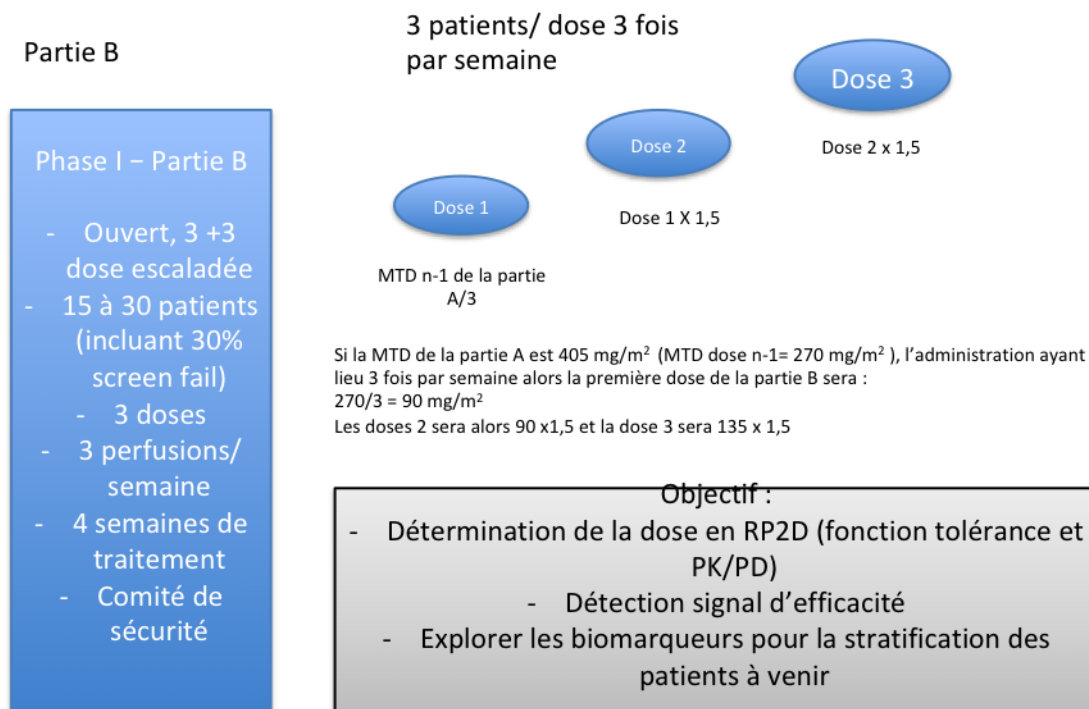


Figure 25 : Partie B de l'essai de phase 1

3. Partie C RP2D :

Objectif : confirmer la partie B, détecter un signal d'efficacité

Une cohorte de patients recevra une dose fixe de ABD-3001 en perfusion intraveineuse de 4 heures, pendant 4 semaines (cycle complet) : l'objectif est d'obtenir un total de 7 à 10 patients, y compris les patients de la partie B.

La posologie (dose et fréquence) est basée sur les paramètres de sécurité et de PK/PD de la partie B, après décision du comité de sécurité :

- Exemple : dose n-1 de MTD de la partie B, avec la même fréquence
- Options si pas de MTD à J28 à la dernière dose 3 :
 - Option 1 : commencer à la dose 3, à la même fréquence que dans la partie B ou
 - Option 2 : commencer à la dose 3, avec une fréquence plus élevée

Évaluation clinique et de la sécurité pendant les 4 semaines de traitement.

Suivi de la sécurité : 4 semaines après la dernière perfusion.

L'objectif est de faire en sorte qu'au moins 7 patients au total (10 au maximum) reçoivent au moins 75 % de leur traitement au cours d'un cycle complet (par exemple, 9 perfusions sur 12 en cas d'ITT).

En l'absence de DLT, le(s) patient(s) continue(nt) à recevoir les perfusions comme prévu

Si 1 DLT :

- Les patients non DLT continuent
- Le traitement du patient atteint d'une EI de "risque DLT" est retardé (pas plus de 7 jours). Si le patient récupère dans les 7 jours un état clinique compatible avec la poursuite de l'étude (ou CTCAE \leq 1), la perfusion reprend pour le patient. Si aucune récupération (c'est-à-dire DLT confirmé) :
 - Le patient sera retiré de l'étude
 - Un nouveau patient commencera un nouveau cycle à la semaine 1, à la même dose

Si 2 DLT se produisent dans la cohorte :

- Le patient non DLT continue(s) et ne sera pas remplacé si un DLT survient avant la semaine 4.
- Recruter de nouveaux patients à une dose utilisée en MAD (idéalement), pour obtenir 7 à 10 patients au total (MAD + RP2D)

III. Réunion de sécurité et commités :

Réunions sur la sécurité :

- seront organisées par le promoteur pour chaque EAS afin d'évaluer ses attentes et de confirmer ou non la gravité, la sévérité et la causalité o

Les réunions de sécurité impliqueront :

- Le directeur médical du promoteur
- Représentants des sponsors (COO, CSO, COD)

Comité d'examen de la sécurité (CRS) :

Le CRS sera mis en place :

- Partie A: avant chaque augmentation de dose et avant la mise en place des doses multiples croissantes
- Patie B : avant chaque augmentation de dose et avant le RP2D
- RP2D : à la fin du W4

Chaque enquêteur aura la possibilité, à sa propre discrétion, de demander à un CRS de confirmer un cas clinique (par exemple entre W1 et W4 en MAD)

Sera présent :

- Coordinateur des enquêteurs
- Directeur médical
- Représentants des sponsors (COO, CSO, COD)
- Représentant de la CRO, sur demande (par exemple, chef de projet, statisticien)

CONCLUSION:

Pourquoi accélérer la production d'oxydants ou utiliser des thérapies antioxydantes fonctionnent dans certains cas, mais échoue dans d'autres ? Comment pouvons-nous prévoir quel type de thérapie d'oxydoréduction pourrait fournir un bénéfice thérapeutique ?

Afin de résoudre ces controverses autour des thérapies redox, il faut d'abord apprécier la complexité du problème :

a) Les tumeurs ne peuvent pas être considérées comme une seule et même maladie. Les types diffèrent grandement dans la façon dont ils se forment, ce qui motive leur croissance, l'invasion et les métastases et quel type de dysrégulation redox elles affichent.

b) Les tumeurs ne peuvent pas être considérées comme une seule et unique masse de tumeurs transformées hautement proliférantes avec des ROS^{high} et ALDH1^{high}

c) Les oxydants ne sont pas égaux. L'identité chimique des produits, la compartimentation et la cinétique.

d) Le rôle des oxydants doit être déterminé individuellement dans chaque tumeur

e) L'immunosurveillance doit être prise en compte. L'importance relative de ce phénomène est liée au contenu qui infiltre les tumeurs et la sensibilité des cellules tumorales à la clairance à médiation immunitaire ainsi qu'au métabolisme propre de la cellule immunitaire.

Une caractérisation et une classification redox détaillées des tumeurs comprenant l'expression des enzymes antioxydantes, la signalisation cellulaire pourrait à terme créer des profils redox afin de déterminer si et comment un type de cancer spécifique peut être ciblé par des thérapies anti-métaboliques.

Les tentatives de créer un modèle prédictif pour chaque patient à partir des paramètres métaboliques de la cellule tumorale devraient être poursuivies.

BIBLIOGRAPHIE :

1. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010 ; 60 :277–300
2. Jones RJ, Matsui WH, Smith BD. Cancer stem cells: are we missing the target? *J Natl Cancer Inst* 2004 ; 96 : 583–585 , Huff CA, Matsui W, Smith BD, Jones RJ. The paradox of response and survival in cancer therapeutics. *Blood* 2006 ; 107 : 431–434
3. Koelling TM, Yeager AM, Hilton J, Haynie DT, Wiley JM. Development and characterization of a cyclophosphamide-resistant subline of acute myeloid leukemia in the Lewis x Brown Norway hybrid rat. *Blood*. 1990
4. Cheung AM, Wan TS, Leung JC, et al. Aldehyde dehydrogenase activity in leukemic blasts defines a subgroup of acute myeloid leukemia with adverse prognosis and superior NOD/SCID engrafting potential. *Leukemia*. 2007
5. Oxidative and reductive metabolism of lipid-peroxidation derived carbonyls, Mahavir Singh, Aniruddh Kapoor, and Aruni Bhatnagar
6. Esterbauer H, Eckl P, Ortner A. Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutat Res* 1990 ; 238 : 223–233
7. Summerfield FW, Tappel AL. Cross-linking of DNA in liver and testes of rats fed 1,3-propanediol. *Chem Biol Interact* 1984 ; 50 : 87–96.
8. Townsend AJ, Leone-Kabler S, Haynes RL, Wu Y, Szweda L, Bunting KD. Selective protection by stably transfected human ALDH3A1 (but not human ALDH1A1) against toxicity of aliphatic aldehydes in V79 cells. *Chem Biol Interact* 2001 ; 130- 132 : 261–273
9. Raza H, John A. 4-hydroxynonenal induces mitochondrial oxidative stress, apoptosis and expression of glutathione S-transferase A4-4 and cytochrome P450 2E1 in PC12 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006
10. Liu W, Kato M, Akhand AA, Hayakawa A, Suzuki H, Miyata T, et al. 4-hydroxynonenal induces a cellular redox status-related activation of the caspase cascade for apoptotic cell death. *J Cell Sci*. 2000
11. Fournet G, Martin G, Quash G. α,β -Acetylenic amino thiolester inhibitors of aldehyde dehydrogenases 1&3: suppressors of apoptogenic aldehyde oxidation and activators of apoptosis. *Curr Med Chem* 2013 ; 20 : 527–533
12. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*

13. G Venton, M Pérez-Alea, C Baier, G Fournet, G Quash, Y Labiad, G Martin, F Sanderson, P Poullin, P Suchon, L Farnault, C Nguyen, C Brunet, I Ceylan and RT Costello, *Blood cancer journal* 2016
14. Shin S, Buel GR, Wolgamott L, Plas DR, Asara JM, Blenis J, Yoon SO. ERK2 mediates metabolic stress response to regulate cell fate. *Mol Cell*. 2015
15. Tang X, Wu J, Ding CK, Lu M, Keenan MM, Lin CC, Lin CA, Wang CC, George D, Hsu DS, Chi JT. Cystine deprivation triggers programmed necrosis in VHL-deficient renal cell carcinomas. *Cancer Res*. 2016
16. Ferroptosis :process and function Y Xie, W Hou1, X Song, Y Yu, J Huang, X Sun, R Kang and D Tang, *cell death and differentiation*, 2016
17. Review Article | Published: 29 May 2009 Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach ? Dunyaporn Trachootham, Jerome Alexandre & Peng Huang, *Nature Reviews Drug Discovery* volume8, pages579–591 (2009).
18. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2391–405.
19. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton D a. G, Gralnick HR, et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *British Journal of Haematology*. 1976;33(4):451–8
20. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017 Jan 26;129(4):424–47
21. Grimwade D. The changing paradigm of prognostic factors in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2012 Dec;25(4):419–25..
22. O'Donnell MR, Tallman MS, Abboud CN, Altman JK, Appelbaum FR, Arber DA, et al. Acute Myeloid Leukemia, Version 3.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2017 Jul;15(7):926–57.
23. Arber DA, Borowitz MJ, Cessna M, Etzell J, Foucar K, Hasserjian RP, et al. Initial Diagnostic Workup of Acute Leukemia: Guideline From the College of American Pathologists and the American Society of Hematology. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2017 Oct;141(10):1342–93..
24. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJP. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood*. 2016 Jan 7;127(1):29–41.
25. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2012 Mar 22;366(12):1079–89.

26. Speck NA, Gilliland DG. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nature Reviews Cancer*. 2002 Jul;2(7):502–13.
27. Zeller B, Gustafsson G, Forestier E, Abrahamsson J, Clausen N, Heldrup J, et al. Acute leukaemia in children with Down syndrome: a population-based Nordic study. *Br J Haematol*. 2005 Mar;128(6):797–804.)
28. University of Chicago Hematopoietic Malignancies Cancer Risk Team. How I diagnose and manage individuals at risk for inherited myeloid malignancies. *Blood*. 2016 06;128(14):1800–13,
29. Godley LA, Shimamura A. Genetic predisposition to hematologic malignancies: management and surveillance. *Blood*. 2017 27;130(4):424–32.).
30. Granfeldt Østgård LS, Medeiros BC, Sengeløv H, Nørgaard M, Andersen MK, Dufva IH, et al. Epidemiology and Clinical Significance of Secondary and Therapy-Related Acute Myeloid Leukemia: A National Population-Based Cohort Study. *J Clin Oncol*. 2015 Nov 1;33(31):3641–9
31. Morton LM, Dores GM, Tucker MA, Kim CJ, Onel K, Gilbert ES, et al. Evolving risk of therapy-related acute myeloid leukemia following cancer chemotherapy among adults in the United States, 1975-2008. *Blood*. 2013 Apr 11;121(15):2996–3004.).
32. Wong TN, Ramsingh G, Young AL, Miller CA, Touma W, Welch JS, et al. Role of TP53 mutations in the origin and evolution of therapy-related acute myeloid leukaemia. *Nature*. 2015 Feb 26;518(7540):552–5.)
33. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2015 Jul 2;126(1):9–16)
34. Ok CY, Patel KP, Garcia-Manero G, Routbort MJ, Peng J, Tang G, et al. TP53 mutation characteristics in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia is similar to de novo diseases. *J Hematol Oncol*. 2015 May 8;8:45.),
35. Zink F, Stacey SN, Norddahl GL, Frigge ML, Magnusson OT, Jonsdottir I, et al. Clonal hematopoiesis, with and without candidate driver mutations, is common in the elderly. *Blood*. 2017 10;130(6):742–52)
36. Young AL, Tong RS, Birmann BM, Druley TE. Clonal haematopoiesis and risk of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2019 Apr 19;)
37. Abelson S, Collord G, Ng SWK, Weissbrod O, Mendelson Cohen N, Niemeyer E, et al. Prediction of acute myeloid leukaemia risk in healthy individuals. *Nature*. 2018;559(7714):400–4.)
38. Sanz MA, Lo Coco F, Martín G, Avvisati G, Rayón C, Barbui T, et al. Definition of relapse risk and role of nonanthracycline drugs for consolidation in patients with acute promyelocytic

- leukemia: a joint study of the PETHEMA and GIMEMA cooperative groups. *Blood*. 2000 Aug 15;96(4):1247–53.).
39. Adès L, Thomas X, Bresler AG, Raffoux E, Spertini O, Vey N, et al. Arsenic trioxide is required in the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. Analysis of a randomized trial (APL 2006) by the French Belgian Swiss APL group. *Haematologica*. 2018 Dec;103(12):2033–9.)
 40. Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, Thiede C, Orlando SM, Iacobelli S, et al. Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2013 Jul 11;369(2):111–21)
 41. Burnett AK, Russell NH, Hills RK, Bowen D, Kell J, Knapper S, et al. Arsenic trioxide and all-trans retinoic acid treatment for acute promyelocytic leukaemia in all risk groups (AML17): results of a randomised, controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2015 Oct 1;16(13):1295–305.).
 42. Fernandez HF, Sun Z, Yao X, Litzow MR, Luger SM, Paietta EM, et al. Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2009 Sep 24;361(13):1249–59.),
 43. Mayer RJ, Davis RB, Schiffer CA, Berg DT, Powell BL, Schulman P, et al. Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B. *N Engl J Med*. 1994 Oct 6;331(14):896–903.)
 44. Pigneux A, Harousseau J-L, Witz F, Sauvezie M, Bene M-C, Luquet I, et al. Addition of lomustine to idarubicin and cytarabine improves the outcome of elderly patients with de novo acute myeloid leukemia: a report from the GOELAMS. *J Clin Oncol*. 2010 Jun 20;28(18):3028–34)
 45. Jourdan E, Boissel N, Chevret S, Delabesse E, Renneville A, Cornillet P, et al. Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013 Mar 21;121(12):2213–23) :
 46. (Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N Engl J Med*. 2017 Aug 3;377(5):454–64).
 47. Lancet JE, Uy GL, Cortes JE, Newell LF, Lin TL, Ritchie EK, et al. CPX-351 (cytarabine and daunorubicin) Liposome for Injection Versus Conventional Cytarabine Plus Daunorubicin in Older Patients With Newly Diagnosed Secondary Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2018 Sep 10;36(26):2684–92.)
 48. Talati C, Sweet K. Recently approved therapies in acute myeloid leukemia: A complex treatment landscape. *Leuk Res*. 2018;73:58–66.)
 49. Percival M-EM, Tao L, Medeiros BC, Clarke CA. Improvements in the early death rate in 9,380 acute myeloid leukemia patients following initial therapy: a SEER database analysis. *Cancer*. 2015 Jun 15;121(12):2004–12.).

50. Juliusson G, Lazarevic V, Hörstedt A-S, Hagberg O, Höglund M. Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed. *Blood*. 2012 Apr 26;119(17):3890–9.)
51. Metzeler KH, Becker H, Maharry K, Radmacher MD, Kohlschmidt J, Mrózek K, et al. ASXL1 mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category. *Blood*. 2011 Dec 22;118(26):6920–9),
52. Kohlmann A, Nadarajah N, Alpermann T, Grossmann V, Schindela S, Dicker F, et al. Monitoring of residual disease by next-generation deep-sequencing of RUNX1 mutations can identify acute myeloid leukemia patients with resistant disease. *Leukemia*. 2014 Jan;28(1):129–37)
53. Rucker FG, Schlenk RF, Bullinger L, Kayser S, Teleanu V, Kett H, et al. TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. *Blood*. 2012 Mar 1;119(9):2114–21)
54. Harada Y, Nagata Y, Kihara R, Ishikawa Y, Asou N, Ohtake S, et al. Prognostic analysis according to the 2017 ELN risk stratification by genetics in adult acute myeloid leukemia patients treated in the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) AML201 study. *Leukemia Research*. 2018 Mar 1;66:20–7.)
55. Boddu PC, Kadia TM, Garcia-Manero G, Cortes J, Alfayez M, Borthakur G, et al. Validation of the 2017 European LeukemiaNet classification for acute myeloid leukemia with NPM1 and FLT3-internal tandem duplication genotypes. *Cancer*. 2019;125(7):1091–100.)
56. Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*. 2002 Dec 15;100(13):4325–36.)
57. Coombs CC, Tavakkoli M, Tallman MS. Acute promyelocytic leukemia: where did we start, where are we now, and the future. *Blood Cancer J*. 2015 Apr 17;5:e304.)
58. Colombo E, Marine J-C, Danovi D, Falini B, Pelicci PG. Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol*. 2002 Jul;4(7):529–33.)
59. Kurki S, Peltonen K, Latonen L, Kiviharju TM, Ojala PM, Meek D, et al. Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. *Cancer Cell*. 2004 May;5(5):465–75.)
60. Itahana K, Bhat KP, Jin A, Itahana Y, Hawke D, Kobayashi R, et al. Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Mol Cell*. 2003 Nov;12(5):1151–64.)
61. Thiede C, Koch S, Creutzig E, Steudel C, Illmer T, Schaich M, et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2006 May 15;107(10):4011–20.)

62. Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, Mecucci C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. *Blood*. 2007 Feb 1;109(3):874–85.)
63. Green CL, Koo KK, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, Gale RE. Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations. *J Clin Oncol*. 2010 Jun 1;28(16):2739–47.)
64. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2008 May 1;358(18):1909–18.)
65. Masuda S. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia: impact on low-risk patients with CEBPA mutations. *J Clin Oncol*. 2011 Dec 1;29(34):4592–3; author reply 4593-4594.)
66. Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD, et al. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res*. 2001 Oct 1;61(19):7233–9)
67. Santos FPS, Jones D, Qiao W, Cortes JE, Ravandi F, Estey EE, et al. Prognostic value of FLT3 mutations among different cytogenetic subgroups in acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2011 May 15;117(10):2145–55.)
68. Lindsley RC, Mar BG, Mazzola E, Grauman PV, Shareef S, Allen SL, et al. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood*. 2015 Feb 26;125(9):1367–76.)
69. Gelsi-Boyer V, Brecqueville M, Devillier R, Murati A, Mozziconacci M-J, Birnbaum D. Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *J Hematol Oncol*. 2012 Mar 21;5:12
70. Bowen D, Groves MJ, Burnett AK, Patel Y, Allen C, Green C, et al. TP53 gene mutation is frequent in patients with acute myeloid leukemia and complex karyotype, and is associated with very poor prognosis. *Leukemia*. 2009 Jan;23(1):203–6.)
71. Gaidzik VI, Teleanu V, Papaemmanuil E, Weber D, Paschka P, Hahn J, et al. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia are associated with distinct clinico-pathologic and genetic features. *Leukemia*. 2016;30(11):2282.),
72. Greif PA, Konstandin NP, Metzeler KH, Herold T, Pasalic Z, Ksienzyk B, et al. RUNX1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia are associated with a poor prognosis and up-regulation of lymphoid genes. *Haematologica*. 2012 Dec;97(12):1909–15.)
73. Short NJ, Rytting ME, Cortes JE. Acute myeloid leukaemia. *The Lancet*. 2018 Aug 18;392(10147):593–606.),

74. Weissmann S, Alpermann T, Grossmann V, Kowarsch A, Nadarajah N, Eder C, et al. Landscape of TET2 mutations in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2012 May;26(5):934–42,
75. Shivarov V, Gueorguieva R, Stoimenov A, Tiu R. DNMT3A mutation is a poor prognosis biomarker in AML: results of a meta-analysis of 4500 AML patients. *Leuk Res*. 2013 Nov;37(11):1445–50.)
76. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2016 Jun 9;374(23):2209–21.)
77. Grossmann V, Haferlach C, Nadarajah N, Fasan A, Weissmann S, Roller A, et al. CEBPA double-mutated acute myeloid leukaemia harbours concomitant molecular mutations in 76·8% of cases with TET2 and GATA2 alterations impacting prognosis. *Br J Haematol*. 2013 Jun;161(5):649–58.)
78. McCurdy SR, Levis MJ. Emerging molecular predictive and prognostic factors in acute myeloid leukemia. *Leukemia & Lymphoma*. 2017 Nov 2;0(0):1–19)
79. Eisfeld A-K, Kohlschmidt J, Mrózek K, Blachly JS, Walker CJ, Nicolet D, et al. Mutation patterns identify adult patients with de novo acute myeloid leukemia aged 60 years or older who respond favorably to standard chemotherapy: an analysis of Alliance studies. *Leukemia*. 2018 Jun;32(6):1338–48.).
80. Pemovska T, Kontro M, Yadav B, Edgren H, Eldfors S, Szwajda A, et al. Individualized systems medicine strategy to tailor treatments for patients with chemorefractory acute myeloid leukemia. *Cancer Discov*. 2013 Dec;3(12):1416–29).
81. Shimamoto T, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Methylation of p15(INK4b) and E-cadherin genes is independently correlated with poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2005 Jun;29(6):653–9).
82. Li Q, Kopecky KJ, Mohan A, Willman CL, Appelbaum FR, Weick JK, et al. Estrogen receptor methylation is associated with improved survival in adult acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 1999 May;5(5):1077–84)
83. Lin T-C, Hou H-A, Chou W-C, Ou D-L, Yu S-L, Tien H-F, et al. CEBPA methylation as a prognostic biomarker in patients with de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2011 Jan;25(1):32–40)
84. Müller-Tidow C, Klein H-U, Hascher A, Isken F, Tickenbrock L, Thoennissen N, et al. Profiling of histone H3 lysine 9 trimethylation levels predicts transcription factor activity and survival in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2010 Nov 4;116(18):3564–71).
85. Deneberg S, Guardiola P, Lennartsson A, Qu Y, Gaidzik V, Blanchet O, et al. Prognostic DNA methylation patterns in cytogenetically normal acute myeloid leukemia are predefined by stem cell chromatin marks. *Blood*. 2011 Nov 17;118(20):5573–82)

86. Deneberg S, Grövdal M, Karimi M, Jansson M, Nahi H, Corbacioglu A, et al. Gene-specific and global methylation patterns predict outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2010 May;24(5):932–41.)
87. Walter RB, Othus M, Borthakur G, Ravandi F, Cortes JE, Pierce SA, et al. Prediction of Early Death After Induction Therapy for Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia With Pretreatment Risk Scores: A Novel Paradigm for Treatment Assignment. *J Clin Oncol*. 2011 Nov 20;29(33):4417–24).
88. Kayastha N, Wolf S, Locke SC, Samsa GP, El-Jawahri A, LeBlanc TW. The Impact of Remission Status on Patients' Experiences with Acute Myeloid Leukemia (AML): An Exploratory Analysis of Longitudinal Patient-Reported Outcomes Data. *Support Care Cancer*. 2018 May;26(5):1437–45.).
89. Vardiman J, Hyjek E. World health organization classification, evaluation, and genetics of the myeloproliferative neoplasm variants. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:250–6.).
90. Weinberg OK, Seetharam M, Ren L, Seo K, Ma L, Merker JD, et al. Clinical characterization of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 WHO classification system. *Blood*. 2009 Feb 26;113(9):1906–8.).
91. Devillier R, Gelsi-Boyer V, Murati A, Prebet T, Rey J, Etienne A, et al. Prognostic significance of myelodysplasia-related changes according to the WHO classification among ELN-intermediate-risk AML patients. *Am J Hematol*. 2015 Jan;90(1):E22-24.).
92. Kayser S, Döhner K, Krauter J, Köhne C-H, Horst HA, Held G, et al. The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed AML. *Blood*. 2011 Feb 17;117(7):2137–45.).
93. Borthakur G, Lin E, Jain N, Estey EE, Cortes JE, O'Brien S, et al. Survival Is Poorer in Patients With Secondary Core-binding Factor Acute Myelogenous Leukemia Compared With De Novo Core-binding Factor Leukemia. *Cancer*. 2009 Jul 15;115(14):3217–21.).
94. Meads MB, Gatenby RA, Dalton WS. Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat Rev Cancer*. 2009 Sep;9(9):665–74.)
95. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994 Feb 17;367(6464):645–8.).
96. van Rhenen A, Feller N, Kelder A, Westra AH, Rombouts E, Zweegman S, et al. High stem cell frequency in acute myeloid leukemia at diagnosis predicts high minimal residual disease and poor survival. *Clin Cancer Res*. 2005 Sep 15;11(18):6520–7).
97. Chen Y-B, Ren S-M, Li S-D, Du Z. Prognostic significance of osteopontin in acute myeloid leukemia: A meta-analysis. *Mol Clin Oncol*. 2017 Aug;7(2):275–80)

98. Spoo AC, Lübbert M, Wierda WG, Burger JA. CXCR4 is a prognostic marker in acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2007 Jan 15;109(2):786–91).
99. Rehman, J. (2010) Empowering self-renewal and differentiation: the role of mitochondria in stem cells. *J. Mol. Med.* 88, 981–986
100. Suda, T. et al. (2011) Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell* 9, 298–310
101. Sarsour, E.H. et al. (2009) Redox control of the cell cycle in health and disease. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 2985–3011].
102. Murphy, M.P. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1–13].
103. Murphy, M.P. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1–13].
104. Orford, K.W. and Scadden, D.T. (2008) Deconstructing stem cell selfrenewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nat. Rev. Genet.* 9, 115–128
105. Raju TN. The Nobel chronicles. 1931: Otto Heinrich Warburg (1883–1970). *Lancet* 352: 2028, 1998.)
106. Ruckstuhl C, Buttner S, Carmona–Gutierrez D, Eisenberg T, Kroemer G, Sigrist SJ, Frohlich KU, and Madeo F. The Warburg effect suppresses oxidative stress induced apoptosis in a yeast model for cancer *PLoS ONE* 4: 4592, 2009).
107. Gogvadze V, Orrenius S, and Zhivotovsky B. Mitochondria as targets for cancer chemotherapy. *Semin Cancer Biol* 19: 57–66, 2009.).
108. Birch–Machin MA. The role of mitochondria in ageing and carcinogenesis. *Clin Exp Dermatol* 31: 548–552, 2006.).
109. Mathupala SP, Ko YH, and Pedersen PL. Hexokinase-2 bound to mitochondria: cancer's stygian link to the "Warburg Effect" and a pivotal target for effective therapy. *Semin Cancer Biol* 19: 17–24, 2009).
110. Costantini P, Jacotot E, Decaudin D, and Kroemer G. Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 92: 1042–1053, 2000).
111. Galluzzi L, Kepp O, Tajeddine N, and Kroemer G. Disruption of the hexokinase-VDAC complex for tumor therapy. *Oncogene* 27: 4633–4635, 2008;
112. Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, and Kroemer G. Targeting post-mitochondrial effectors of apoptosis for neuroprotection. *Biochim Biophys Acta* 1787: 402–413, 2009)
113. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, and Schumacker PT. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: A mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem* 275: 25130– 25138, 2000.).

113. Bell EL, Klimova T, and Chandel NS. Targeting the mitochondria for cancer therapy: Regulation of hypoxia-inducible factor by mitochondria. *Antioxid Redox Signal* 10: 635–640, 2008).
114. A threshold concept for cancer Therapy, *Medical Hypotheses* (2000) **55**(1), 29–35)
115. Kong Q., Lillehei K. O. Antioxidant inhibitors for cancer therapy. *Med Hypotheses* 1998 ; 51 : 405–409.
116. N. Lane, *Oxygen: The Molecule that Made the World*, Oxford University Press, 2002.
117. B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, “Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease,” *Biochemical Journal*, vol. 219, no. 1, pp. 1–14, 1984
118. J. L. Venero, M. Revuelta, L. Atiki et al., “Evidence for dopamine-derived hydroxyl radical formation in the nigrostriatal system in response to axotomy,” *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 34, no. 1, pp. 111–123, 2003.
119. B. Lipinski and E. Pretorius, “Hydroxyl radical-modified fibrinogen as a marker of thrombosis: the role of iron,” *Hematology*, vol. 17, no. 4, pp. 241–247, 2012
120. M. Dizdaroğlu and P. Jaruga, “Mechanisms of free radical-induced damage to DNA,” *Free Radical Research*, vol. 46, no. 4, pp. 382–419, 2012
121. B. H. J. Bielski, R. L. Arudi, and M. W. Sutherland, “A study of the reactivity of HO₂/O₂- with unsaturated fatty acids,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 258, no. 8, pp. 4759–4761, 1983
122. C. Schneider, W. E. Boeglin, H. Yin, N. A. Porter, and A. R. Brash, “Intermolecular peroxy radical reactions during autoxidation of hydroxy and hydroperoxy arachidonic acids generate a novel series of epoxidized products,” *Chemical Research in Toxicology*, vol. 21, no. 4, pp. 895–903, 2008
123. H. Esterbauer, K. H. Cheeseman, and M. U. Dianzani, “Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes,” *Biochemical Journal*, vol. 208, no. 1, pp. 129–140, 1982
124. A. Benedetti, M. Comporti, and H. Esterbauer, “Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids,” *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 620, no. 2, pp. 281–296, 1980.;
125. H. Esterbauer, J. Lang, S. Zdravcevic, and T. F. Slater, “Detection of malonaldehyde by high-performance liquid chromatography,” *Methods in Enzymology*, vol. 105, pp. 319–328, 1984;
126. H. Esterbauer, A. Benedetti, J. Lang, R. Fulceri, G. Fauler, and M. Comporti, “Studies on the mechanism of formation of 4-hydroxynonenal during microsomal lipid peroxidation,” *Biochimica et Biophysica Acta: Lipids and Lipid Metabolism*, vol. 876, no. 1, pp. 154–166, 1986;

127. K. H. Cheeseman, A. Beavis, and H. Esterbauer, "Hydroxylradical- induced iron-catalysed degradation of 2-deoxyribose. Quantitative determination of malondialdehyde," *Biochemical Journal*, vol. 252, no. 3, pp. 649–653, 1988.
128. H. Esterbauer, P. Eckl, and A. Ortner, "Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors," *Mutation Research*, vol. 238, no. 3, pp. 223–233, 1990.
129. G. Brambilla, L. Sciab`a, P. Faggini et al., "Cytotoxicity, DNA fragmentation and sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary cells exposed to the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal and homologous aldehydes," *Mutation Research*, vol. 171, no. 2-3, pp. 169–176, 1986
130. N. Zarkovic, "4-Hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes," *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 24, no. 4-5, pp. 281–291, 2003.
131. A. Negre-Salvayre, C. Coatrieux, C. Ingueneau, and R. Salvayre, "Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors," *British Journal of Pharmacology*, vol. 153, no. 1, pp. 6–20, 2008
132. S. Pizzimenti, E. Ciamporcerro, M. Daga et al., "Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins," *Frontiers in Physiology*, vol. 4, article 242, 2013.
133. D. A. Slatter, N. C. Avery, and A. J. Bailey, "Identification of a new cross-link and unique histidine adduct from bovine serum albumin incubated with malondialdehyde," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 1, pp. 61–69, 2004
134. J. Cheng, F. Wang, D.-F. Yu, P.-F. Wu, and J.-G. Chen, "The cytotoxic mechanism of malondialdehyde and protective effect of carnosine via protein cross-linking/mitochondrial dysfunction/reactive oxygen species/MAPK pathway in neurons," *European Journal of Pharmacology*, vol. 650, no. 1, pp. 184–194, 2011
135. W. Siems and T. Grune, "Intracellular metabolism of 4- hydroxynonenal," *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 24, no. 4- 5, pp. 167–175, 2003.
136. S. Dalleau, M. Baradat, F. Gu´eraud, and L. Huc, "Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance," *Cell Death and Differentiation*, vol. 20, no. 12, pp. 1615–1630, 2013
137. C. M. Spickett, "The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal: advances in chemistry and analysis," *Redox Biology*, vol. 1, no. 1, pp. 145–152, 2013
138. L. M. Balogh and W. M. Atkins, "Interactions of glutathione transferases with 4-hydroxynonenal," *Drug Metabolism Reviews*, vol. 43, no. 2, pp. 165–178, 2011
139. W. Siems and T. Grune, "Intracellular metabolism of 4- hydroxynonenal," *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 24, no. 4- 5, pp. 167–175, 2003
140. J. Alary, F. Gu´eraud, and J.-P. Cravedi, "Fate of 4-hydroxynonenal in vivo: disposition and metabolic pathways," *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 24, no. 4-5, pp. 177–187, 2003

141. K. E. McElhanon, C. Bose, R. Sharma, L. Wu, Y. C. Awasthi, and S. P. Singh, "Gsta4nullmouse embryonicfibroblasts exhibit enhanced sensitivity to oxidants: role of 4-hydroxynonenal in oxidant toxicity," *Open Journal of Apoptosis*, vol. 2, no. 1, 2013
142. W. Black, Y. Chen, A. Matsumoto et al., "Molecular mechanisms of ALDH3A1-mediated cellular protection against 4-hydroxy-2-nonenal," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 52, no. 9, pp. 1937–1944, 2012
143. P. Chaudhary, R. Sharma, A. Sharma et al., "Mechanisms of 4- hydroxy-2-nonenal induced pro- and anti-apoptotic signaling," *Biochemistry*, vol. 49, no. 29, pp. 6263–6275, 2010
144. S. Haupt, M. Berger, Z. Goldberg, and Y. Haupt, "Apoptosis— the p53 network," *Journal of Cell Science*, vol. 116, no. 20, pp. 4077–4085, 2003.
145. S. O. Abarikwu, A. B. Pant, and E. O. Farombi, "4- hydroxynonenal induces mitochondrial-mediated apoptosis and oxidative stress in SH-SY5Y human neuronal cells," *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, vol. 110, no. 5, pp. 441–448, 2012
146. Y. C. Awasthi, R. Sharma, A. Sharma et al., "Self-regulatory role of 4-hydroxynonenal in signaling for stress-induced programmed cell death," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 45, no. 2, pp. 111–118, 2008.
147. Hole, P.S., R.L. Darley & A. Tonks. 2011. Do reactive oxygen species play a role in myeloid leukemias? *Blood* **117**: 5816– 5826, Naka, K. & A. Hirao. 2011. Maintenance of genomic integrity in hematopoietic stem cells. *Int. J. Hematol.* **93** : 434–439
148. Godfrey, R. et al. 2012. Cell transformation by FLT3 ITD in acute myeloid leukemia involves oxidative inactivation of the tumor suppressor protein-tyrosine phosphatase DEP- 1/PTPRJ. *Blood* **119**: 4499–4511
149. Zhou, F.L. et al. 2010. Involvement of oxidative stress in the relapse of acute myeloid leukemia. *J. Biol. Chem.* **285**: 15010–15015, Pei, S. et al. 2013.
150. Targeting aberrant glutathione metabolism to eradicate human acute myelogenous leukemia cells. *J. Biol. Chem.* **288**: 33542–33558
151. L. Behrend, G. Henderson, and R. M. Zwacka, "Reactive oxygen species in oncogenic transformation," *Biochemical Society Transactions*, vol. 31, no. 6, pp. 1441–1444, 2003
152. W. S. Wu, "The signaling mechanism of ROS in tumor progression," *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 25, no. 4, pp. 695–705, 2006
153. H. Pelicano, D. Carney, and P. Huang, "ROS stress in cancer cells and therapeutic implications," *Drug Resistance Updates*, vol. 7, no. 2, pp. 97–110, 2004
154. P. T. Schumacker, "Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword," *Cancer Cell*, vol. 10, no. 3, pp. 175–176, 2006
155. W. H. Chiu, S. J. Luo, C. L. Chen et al., "Vinca alkaloids cause aberrant ROS-mediated JNK activation, Mcl-1 downregulation, DNA damage, mitochondrial dysfunction, and apoptosis in lung adenocarcinoma cells," *Biochemical Pharmacology*, vol. 83, pp. 1159–1171, 2012.

156. C. Casares, R. Ramírez-Camacho, A. Trinidad, A. Roldán, E. Jorge, and J. R. García-Berrocal, "Reactive oxygen species in apoptosis induced by cisplatin: review of physiopathological mechanisms in animal models," *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*
157. J. Fang, H. Nakamura, and A. K. Iyer, "Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy," *Journal of Drug Targeting*, vol. 15, no. 7-8, pp. 475–486, 2007
158. K. K. Kim, T. S. Lange, R. K. Singh, L. Brard, and R. G. Moore, "Tetrathiomolybdate sensitizes ovarian cancer cells to anticancer drugs doxorubicin, fenretinide, 5-fluorouracil and mitomycin C," *BMC Cancer*, vol. 12, p. 147, 2012
159. Y.W. Zhang, J. Shi, Y. J. Li, and L. Wei, "Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity," *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis*, vol. 57, pp. 435–445, 2009
160. I. Müller, D. Niethammer, and G. Bruchelt, "Anthracycline-derived chemotherapeutics in apoptosis and free radical cytotoxicity (Review)," *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 1, no. 2, pp. 491–494, 1998
161. Y. Li, C. Rory Goodwin, Y. Sang, E. M. Rosen, J. Laterra, and S. Xia, "Camptothecin and Fas receptor agonists synergistically induce medulloblastoma cell death: ROS-dependent mechanisms," *Anti-Cancer Drugs*, vol. 20, no. 9, pp. 770–778, 2009
162. H. Tomita, K. Tanaka, T. Tanaka, A. Hara, Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer, *Oncotarget* 7 (10) (2016) 11018e11032
163. R.F. Borch, J.A. Millard, The mechanism of activation of 4- hydroxycyclophosphamide, *J. Med. Chem.* 30 (2) (1987) 427e431
164. L. Luznik, P.V. O'Donnell, H.J. Symons, A.R. Chen, M.S. Leffell, M. Zahurak, et al., HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide, *Biol. Blood Marrow Transpl.* 14 (6) (2008)
165. M. Gasparetto, S. Pei, M. Minhajuddin, N. Khan, D.A. Pollyea, J.R. Myers, et al., Targeted therapy for a subset of acute myeloid leukemias that lack expression of aldehyde dehydrogenase 1A1, *Haematologica* 102 (6) (2017 Jun) 1054e1065
166. T. Lapidot, C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, et al., A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice, *Nature* 367 (6464) (1994) 645e648
167. A.M. Cheung, T.S. Wan, J.C. Leung, L.Y. Chan, H. Huang, Y.L. Kwong, et al., Aldehyde dehydrogenase activity in leukemic blasts defines a subgroup of acute myeloid leukemia with adverse prognosis and superior NOD/SCID engrafting potential, *Leukemia* 21 (7) (2007) 1423e1430

168. V.T. Hoang, E.C. Buss, W. Wang, I. Hoffmann, S. Raffel, A. Zepeda-Moreno, et al., The rarity of ALDH(b) cells is the key to separation of normal versus leukemia stem cells by ALDH activity in AML patients, *Int. J. Cancer* 137 (3) (2015) 525e536.
169. J.M. Gerber, B.D. Smith, B. Ngwang, H. Zhang, M.S. Vala, L. Morsberger, et al., A clinically relevant population of leukemic CD34(b)CD38(-) cells in acute myeloid leukemia, *Blood* 119 (15) (2012) 3571e3577
170. Dalton TP, Chen Y, Schneider SN, Nebert DW, Shertzer HG. Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 1511–1526
171. Armstrong JS, Whiteman M, Yang H, Jones DP, Sternberg Jr P. Cysteine starvation activates the redox-dependent mitochondrial permeability transition in retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 4183–4189.
172. Diaz-Hernandez JI, Almeida A, Delgado-Esteban M, Fernandez E, Bolanos JP. Knockdown of glutamate-cysteine ligase by small hairpin RNA reveals that both catalytic and modulatory subunits are essential for the survival of primary neurons. *J Biol Chem* 2005; 280: 38992–39001
173. Botta D, Franklin CC, White CC, Krejsa CM, Dabrowski MJ, Pierce RH et al. Glutamate-cysteine ligase attenuates TNF-induced mitochondrial injury and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 632–642.
174. Dickinson DA, Levonen AL, Moellering DR, Arnold EK, Zhang H, Darley-Usmar VM et al. Human glutamate cysteine ligase gene regulation through the electrophile response element. *Free Radic Biol Med* 2004 ; 37: 1152–1159
175. Wild AC, Moinova HR, Mulcahy RT. Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem* 1999; 274: 33627– 33636
176. Chanas SA, Jiang Q, McMahon M, McWalter GK, McLellan LI, Elcombe CR et al. Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2, Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm4 genes in the livers of male and female mice. *Biochem J* 2002 ; 365 : 405–416.
177. Morito N, Yoh K, Itoh K, Hirayama A, Koyama A, Yamamoto M et al. Nrf2 regulates the sensitivity of death receptor signals by affecting intracellular glutathione levels. *Oncogene* 2003 ; 22 : 9275–9281
178. Shih AY, Johnson DA, Wong G, Kraft AD, Jiang L, Erb H et al. Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *J Neurosci* 2003 ; 23 : 3394–3406
179. Friesen C, Kiess Y, Debatin KM. 2004 A critical role of glutathione in determining apoptosis sensitivity and resistance in leukemia cells. *Cell Death Differ* 2004 ; 11 (Suppl 1) : S73–S85

180. Armstrong JS, Steinauer KK, Hornung B, Irish JM, Lecane P, Birrell GW et al. Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line. *Cell Death Differ* 2002 ; 9: 252–263
181. Franco R, Panayiotidis MI, Cidlowski JA. Glutathione depletion is necessary for apoptosis in lymphoid cells independent of reactive oxygen species formation. *J Biol Chem* 2007 ; 282 : 30452–30465
182. Wang X, Cederbaum AI. S-adenosyl-L-methionine attenuates hepatotoxicity induced by agonistic Jo2 Fas antibody following CYP2E1 induction in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2006 ; 317 : 44–52
183. Will Y, Kaetzel RS, Brown MK, Fraley TS, Reed DJ. In vivo reversal of glutathione deficiency and susceptibility to in vivo dexamethasone-induced apoptosis by N-acetylcysteine and L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid, but not ascorbic acid, in thymocytes from gamma-glutamyltranspeptidase-deficient knockout mice. *Arch Biochem Biophys* 2002 ; 397 : 399–406
184. Marchetti P, Decaudin D, Macho A, Zamzami N, Hirsch T, Susin SA et al. Redox regulation of apoptosis: impact of thiol oxidation status on mitochondrial function. *Eur J Immunol* 1997 ; 27 : 289–296
185. Muyderman H, Wadey AL, Nilsson M, Sims NR. Mitochondrial glutathione protects against cell death induced by oxidative and nitrative stress in astrocytes. *J Neurochem* 2007 ; 102 : 1369–1382
186. Botta D, Franklin CC, White CC, Krejsa CM, Dabrowski MJ, Pierce RH et al. Glutamylcysteine ligase attenuates TNF-induced mitochondrial injury and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 632–642
187. Circu ML, Rodriguez C, Maloney R, Moyer MP, Aw TY. Contribution of mitochondrial GSH transport to matrix GSH status and colonic epithelial cell apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2008 ; 44 : 768–778
188. Blair IA. Endogenous glutathione adducts. *Curr Drug Metab* 2006 ; 7 : 853–872.
189. Franco R, Cidlowski JA. SLCO/OATP-like transport of glutathione in FasL-induced apoptosis: glutathione efflux is coupled to an organic anion exchange and is necessary for the progression of the execution phase of apoptosis. *J Biol Chem* 2006 ; 281 : 29542–29557.
190. D'Alessio M, De Nicola M, Coppola S, Gualandi G, Pugliese L, Cerella C et al. Oxidative Bax dimerization promotes its translocation to mitochondria independently of apoptosis. *Faseb J* 2005 ; 19 : 1504–1506
191. Brown GC, Borutaite V. Regulation of apoptosis by the redox state of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta* 2008 ; 1777 : 877–881
192. Vaughn AE, Deshmukh M. Glucose metabolism inhibits apoptosis in neurons and cancer cells by redox inactivation of cytochrome c. *Nat Cell Biol* 2008 ; 10 : 1477–1483

193. Ellerby LM, Ellerby HM, Park SM, Holleran AL, Murphy AN, Fiskum G et al. Shift of the cellular oxidation-reduction potential in neural cells expressing Bcl-2. *J Neurochem* 1996 ; 67 : 1259–1267
194. Zimmermann AK, Loucks FA, Schroeder EK, Bouchard RJ, Tyler KL, Linseman DA. Glutathione binding to the Bcl-2 homology-3 domain groove: A molecular basis for Bcl-2 antioxidant function at mitochondria. *J Biol Chem* 2007 ; 282 : 29296–29304
195. Green RM, Graham M, O'Donovan MR, Chipman JK, Hodges NJ. Subcellular compartmentalization of glutathione: correlations with parameters of oxidative stress related to genotoxicity. *Mutagenesis* 2006 ; 21 : 383–390
196. Kamada K, Goto S, Okunaga T, Ihara Y, Tsuji K, Kawai Y et al. Nuclear glutathione S-transferase pi prevents apoptosis by reducing the oxidative stress-induced formation of exocyclic DNA products. *Free Radic Biol Med* 2004 ; 37 : 1875–1884
197. Hollins DL, Suliman HB, Piantadosi CA, Carraway MS. Glutathione regulates susceptibility to oxidant-induced mitochondrial DNA damage in human lymphocytes. *Free Radic Biol Med* 2006 ; 40 : 1220–1226
198. Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ* 2007; 14: 1237–1243
199. Filomeni G, Aquilano K, Civitareale P, Rotilio G, Ciriolo MR. Activation of c-Jun-N-terminal kinase is required for apoptosis triggered by glutathione disulfide in neuroblastoma cells. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 345–354.
200. Pias EK, Aw TY. Early redox imbalance mediates hydroperoxide-induced apoptosis in mitotic competent undifferentiated PC-12 cells. *Cell Death Differ* 2002; 9: 1007–1016.
201. Ho HY, Cheng ML, Chiu DT. Glucose-6-phosphate dehydrogenase – from oxidative stress to cellular functions and degenerative diseases. *Redox Rep* 2007; 12: 109–118
202. Ayene IS, Biaglow JE, Kachur AV, Stamato TD, Koch CJ. Mutation in G6PD gene leads to loss of cellular control of protein glutathionylation: Mechanism and implication. *J Cell Biochem* 2008; 103: 123–135
203. Fico A, Paglialunga F, Cigliano L, Abrescia P, Verde P, Martini G et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a crucial role in protection from redox-stress-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2004; 11: 823–831
204. Gendron MC, Schrantz N, Metivier D, Kroemer G, Maciorowska Z, Sureau F et al. Oxidation of pyridine nucleotides during Fas- and ceramide-induced apoptosis in Jurkat cells: Correlation with changes in mitochondria, glutathione depletion, intracellular acidification and caspase 3 activation. *Biochem J* 2001; 353: 357–367

205. Banki K, Hutter E, Colombo E, Gonchoroff NJ, Perl A. Glutathione levels and sensitivity to apoptosis are regulated by changes in transaldolase expression. *J Biol Chem* 1996; 271: 32994–33001
206. Delgado-Esteban M, Almeida A, Bolanos JP. D-Glucose prevents glutathione oxidation and mitochondrial damage after glutamate receptor stimulation in rat cortical primary neurons. *J Neurochem* 2000; 75: 1618–1624
207. Minich T, Riemer J, Schulz JB, Wielinga P, Wijnholds J, Dringen R. The multidrug resistance protein 1 (Mrp1), but not Mrp5, mediates export of glutathione and glutathione disulfide from brain astrocytes. *J Neurochem* 2006; 97: 373–384.
208. Ishii T, Itoh K, Takahashi S, Sato H, Yanagawa T, Katoh Y, et al. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *The Journal of Biological Chemistry* 2000;275:16023–29
209. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes & Development* 1999;13:76–86
210. Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T, et al. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Molecular and Cellular Biology* 2004;24:7130–9
211. Kobayashi M, Yamamoto M. Molecular mechanisms activating the Nrf2- Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxidants & Redox Signaling* 2005;7:385–94
212. Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1- Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to Cells* 2011;16:123–40
213. Sasaki H, Sato H, Kuriyama-Matsumura K, Sato K, Maehara K, Wang H, et al. Electrophile response element-mediated induction of the cystine/glutamate exchange transporter gene expression. *The Journal of Biological Chemistry* 2002;277:44765–71..
214. Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, Saarloos I, Wirtz KW, Coffey PJ, et al. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* 2002;419:316–21
215. Nemoto S, Finkel T. Redox regulation of forkhead proteins through a p66shcdependent signaling pathway. *Science* 2002;295:2450–2.
216. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer* 2011;11:85–95.;
217. Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* 2009;458:780–3
218. Yahata T, Takanashi T, Muguruma Y, Ibrahim AA, Matsuzawa H, Uno T, Sheng Y, Onizuka M, Ito M, Kato S, and Ando K. Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. *Blood* 118: 2941–2950, 2011

219. Yahata T, Muguruma Y, Yumino S, Sheng Y, Uno T, Matsuzawa H, Ito M, Kato S, Hotta T, and Ando K. Quiescent human hematopoietic stem cells in the bone marrow niches organize the hierarchical structure of hematopoiesis. *Stem Cells* 26: 3228–3236, 2008.
220. Ito K, Hirao A, Arai F, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, Ohmura M, Naka K, Hosokawa K, Ikeda Y, and Suda T. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 12: 446–451, 2006
221. Yahata T, Takanashi T, Muguruma Y, Ibrahim AA, Matsuzawa H, Uno T, Sheng Y, Onizuka M, Ito M, Kato S, and Ando K. Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. *Blood* 118: 2941–2950, 2011
222. Lagadinou E, Callahan K, Neering SJ, Pei S, Minhajuddin M, Rossi RM, Grose V, Corbett C, Balys M, Brookes P, and Jordan CT. Reactive oxygen species (ROS) levels define functional heterogeneity in human leukemia stem cells and represent a critical parameter for therapeutic targeting [abstract]. American Society of Hematology. San Diego, CA: Blood, 2011.
223. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 2013; 6: p11.
224. Canuto RA, Muzio G, Salvo RA, Maggiora M, Trombetta A, Chantepie J et al. The effect of a novel irreversible inhibitor of aldehyde dehydrogenases 1 and 3 on tumour cell growth and death. *Chem Biol Interact* 2001; 130–132: 209–218
225. Quash G, Fournet G, Courvoisier C, Martinez RM, Chantepie J, Paret MJ et al. Aldehyde dehydrogenase inhibitors: alpha,beta-acetylenic N-substituted aminothiolesters are reversible growth inhibitors of normal epithelial but irreversible apoptogens for cancer epithelial cells from human prostate in culture. *Eur J Med Chem* 2008; 43: 906–916.
226. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010 ; 60 :277–300.
227. Jones RJ, Matsui WH, Smith BD. Cancer stem cells: are we missing the target? *J Natl Cancer Inst* 2004 ; 96 : 583–585
228. Huff CA, Matsui W, Smith BD, Jones RJ. The paradox of response and survival in cancer therapeutics. *Blood* 2006 ; 107 : 431–434
229. Koelling TM, Yeager AM, Hilton J, Haynie DT, Wiley JM. Development and characterization of a cyclophosphamide-resistant subline of acute myeloid leukemia in the Lewis x Brown Norway hybrid rat. *Blood*. 1990
230. Cheung AM, Wan TS, Leung JC, et al. Aldehyde dehydrogenase activity in leukemic blasts defines a subgroup of acute myeloid leukemia with adverse prognosis and superior NOD/SCID engrafting potential. *Leukemia*. 2007
231. Oxidative and reductive metabolism of lipid-peroxidation derived carbonyls, Mahavir Singh, Aniruddh Kapoor, and Aruni Bhatnagar

232. Esterbauer H, Eckl P, Ortner A. Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutat Res* 1990 ; 238 : 223–233.
233. Summerfield FW, Tappel AL. Cross-linking of DNA in liver and testes of rats fed 1,3-propanediol. *Chem Biol Interact* 1984 ; 50 : 87–96.
234. Townsend AJ, Leone-Kabler S, Haynes RL, Wu Y, Szweda L, Bunting KD. Selective protection by stably transfected human ALDH3A1 (but not human ALDH1A1) against toxicity of aliphatic aldehydes in V79 cells. *Chem Biol Interact* 2001 ; 130- 132 : 261–273.
235. Cell death and diseases related to oxidative stress:4-hydroxynonenal (HNE) in the balance
236. Raza H, John A. 4-hydroxynonenal induces mitochondrial oxidative stress, apoptosis and expression of glutathione S-transferase A4-4 and cytochrome P450 2E1 in PC12 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006
237. Liu W, Kato M, Akhand AA, Hayakawa A, Suzuki H, Miyata T, et al. 4-hydroxynonenal induces a cellular redox status-related activation of the caspase cascade for apoptotic cell death. *J Cell Sci*. 2000
238. Fournet G, Martin G, Quash G. α,β -Acetylenic amino thiolester inhibitors of aldehyde dehydrogenases 1&3: suppressors of apoptogenic aldehyde oxidation and activators of apoptosis. *Curr Med Chem* 2013 ; 20 : 527–533.
239. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*
240. Aldehyde dehydrogenases inhibition eradicates leukemia stem cells while sparing normal progenitors, G Venton, M Pérez-Alea, C Baier, G Fournet, G Quash, Y Labiad, G Martin, F Sanderson, P Poullin, P Suchon, L Farnault, C Nguyen, C Brunet, I Ceylan and RT Costello, *Blood cancer journal* 2016
241. Shin S, Buel GR, Wolgamott L, Plas DR, Asara JM, Blenis J, Yoon SO. ERK2 mediates metabolic stress response to regulate cell fate. *Mol Cell*. 2015
242. Shin S, Buel GR, Wolgamott L, Plas DR, Asara JM, Blenis J, Yoon SO. ERK2 mediates metabolic stress response to regulate cell fate. *Mol Cell*. 2015
243. Tang X, Wu J, Ding CK, Lu M, Keenan MM, Lin CC, Lin CA, Wang CC, George D, Hsu DS, Chi JT. Cystine deprivation triggers programmed necrosis in VHL-deficient renal cell carcinomas. *Cancer Res*. 2016
244. Ferroptosis: process and function Y Xie, W Hou1, X Song, Y Yu, J Huang, X Sun, R Kang and D Tang, *cell death and differentiation*, 2016
245. Review Article | Published: 29 May 2009 Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach ? Dunyaporn Trachootham, Jerome Alexandre & Peng Huang, *Nature Reviews Drug Discovery* volume8, pages579–591 (2009)

246. Bruserud O, Ulvestad E, Berentsen S, Bergheim J, Nesthus I. T-lymphocyte functions in acute leukaemia patients with severe chemotherapy-induced cytopenia: characterization of clonogenic T-cell proliferation. *Scand J Immunol* 1998.
247. De Angulo G, Yuen C, Palla SL, Anderson PM, Zweidler-McKay PA. Absolute lymphocyte count is a novel prognostic indicator in ALL and AML: implications for risk stratification and future studies. *Cancer* 2008.
248. Ohnishi K, Yamanishi H, Naito K et al. Reconstitution of peripheral blood lymphocyte subsets in the long-term disease-free survivors of patients with acute myeloblastic leukemia. *Leukemia* 1998.
249. . Ohnishi K, Yamanishi H, Naito K et al. Reconstitution of peripheral blood lymphocyte subsets in the long-term disease-free survivors of patients with acute myeloblastic leukemia. *Leukemia* 1998.
250. Verheyden S, Bernier M, Demanet C. Identification of natural killer cell receptor phenotypes associated with leukemia. *Leukemia* 2004.
251. Dermime S, Mavroudis D, Jiang YZ, Hensel N, Molldrem J, Barrett AJ. Immune escape from a graft-versus-leukemia effect may play a role in the relapse of myeloid leukemias following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1997.
252. Vago L, Perna SK, Zanussi M et al. Loss of mismatched HLA in leukemia after stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2009.
253. Baessler T, Krusch M, Schmiedel BJ et al. Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein ligand subverts immunosurveillance of acute myeloid leukemia in humans. *Cancer Res* 2009.
254. Whiteway A, Corbett T, Anderson R, Macdonald I, Prentice HG. Expression of co-stimulatory molecules on acute myeloid leukaemia blasts may effect duration of first remission. *Br J Haematol* 2003.
255. Scholl N, Loibl J, Kremser A et al. The role of soluble and cell-surface expressed 4-1BB ligand in patients with malignant hemopoietic disorders. *Leuk Lymph* 2009.
256. Van Luijn MM, Chamuleau ME, Thompson JA et al. CLIP down-modulation enhances the immunogenicity of myeloid leukemic blasts resulting in increased CD4+ T cell responses. *Haematologica* 2010.
257. Orleans-Lindsay JK, Barber LD, Prentice HG, Lowdell MW. Acute myeloid leukaemia cells secrete a soluble factor that inhibits T and NK cell proliferation but not cytolytic function - implications for the adoptive immunotherapy of leukaemia. *Cancer* 1979.

258. Tong XM, Yao HP, Qian WB et al. The biological characteristics of dendritic cells derived in vitro from myelogeneous leukemia cells and healthy donor cells. *Int J Lab Hematol* 2008.
259. Schui DK, Singh L, Schneider B, Knau A, Hoelzer D, Weidmann E. Inhibiting effects on the induction of cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells pulsed with lysates from acute myeloid leukemia blasts. *Leuk Res* 2002.
260. Ge W, Ma X, Li X et al. B7-H1 up-regulation on dendritic-like leukemia cells suppresses T cell immune function through modulation of IL-10/IL-12 production and generation of Treg cells. *Leuk Res* 2009.
261. Wang X, Zheng J, Liu J et al. Increased population of CD4(+)CD25(high), regulatory T cells with their higher apoptotic and proliferating status in peripheral blood of acute myeloid leukemia patients. *Eur J Haematol* 2005.
262. Li Y, Yin Q, Yang L et al. Reduced levels of recent thymic emigrants in acute myeloid leukemia patients. *Cancer Immunol Immunother* 2009.
263. Le Dieu R, Taussig DC, Ramsay AG et al. Peripheral blood T cells in acute myeloid leukemia (AML) patients at diagnosis have abnormal phenotype and genotype and form defective immune synapses with AML blasts. *Blood* 2009.
264. Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia, Costello R, *Blood*, 2002 May 15.
265. Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: Evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction. Fauriat C, *Blood*. 2007 Jan 1.
266. Cytolytic function and survival of natural killer cells are severely altered in myelodysplastic syndromes. Kiladjian JJ, *Leukemia*. 2006 Mar.
267. Reduced natural killer (NK) function associated with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and reduced expression of activating NK receptors. Epling-Burnette PK, *Blood*. 2007 Jun 1.
268. Zhi-Gang Z, Wei-Ming L, Zhi-Chao C, Yong Y, Ping Z. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patient with hematological malignant diseases. *Leuk Lymph* 2008.
269. Lapidot T, Goichberg P, Lapid K, Avigdor A, Kollet O. The endosteum region keeps human leukemic stem cells alive. *Cell Stem Cell* 2007.
270. Venton, G. *et al.* Aldehyde dehydrogenases inhibition eradicates leukemia stem cells while sparing normal progenitors. *Blood Cancer J.* **6**, e469 (2016).
271. (Arsenic Trioxide Exerts Antitumor Activity through Regulatory T Cell Depletion Mediated by Oxidative Stress in a Murine Model of Colon Cancer, *J Immunol* 2012; 189:5171-5177)
272. (Glycolysis regulates the expansion of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing hosts through prevention of ROS-mediated apoptosis, *Cell Death and Disease* (2017) 8, e2779)

273. [A. Soriani, et al., Reactive oxygen species- and DNA damage response-dependent NK cell activating ligand upregulation occurs at transcriptional levels and requires the transcriptional factor E2F1, *J. Immunol.* 193 (2) (2014) 950–960.]
274. A. Sagiv, et al., NKG2D ligands mediate immunosurveillance of senescent cells *Aging* 8 (2) (2016) 328–344.].
275. O. Werlenius, et al., Reactive oxygen species induced by therapeutic CD20 antibodies inhibit natural killer cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity against primary CLL cells, *Oncotarget* 7 (22) (2016) 32046–32053
276. K. Mimura, et al., Upregulation of thioredoxin-1 in activated human NK cells confers increased tolerance to oxidative stress, *Cancer Immunol. Immunother.* 66 (5) (2017) 605–613.
277. A. Martner, et al., Redox remodeling by dendritic cells protects antigen-specific T cells against oxidative stress, *J. Immunol.* 187 (12) (2011) 6243–6248.
278. T. Ishimoto, et al., Macrophage-derived reactive oxygen species suppress miR-328 targeting CD44 in cancer cells and promote redox adaptation, *Carcinogenesis* 35 (5) (2014) 1003–1011.).
279. G.J. van der Bij, et al., Experimentally induced liver metastases from colorectal cancer can be prevented by mononuclear phagocyte-mediated monoclonal antibody therapy, *J. Hepatol.* 53 (4) (2010) 677–685
280. M.A. Ligtenberg, et al., Coexpressed catalase protects chimeric antigen receptorredirected T cells as well as bystander cells from oxidative stress-induced loss of antitumor activity, *J. Immunol.* 196 (2) (2016) 759–766.
281. Griess B, Tom E, Domann F, Teoh-Fitzgerald M. Extracellular superoxide dismutase and its role in cancer. *Free Radic Biol Med* (2017)
282. Mougiakakos D, Johansson CC, Kiessling R. Naturally occurring regulatory T cells show reduced sensitivity toward oxidative stress-induced cell death. *Blood* (2009) 113(15):3542–5. doi:10.1182/blood-2008-09-181040)
283. Belikov AV, Schraven B, Simeoni L. T cells and reactive oxygen species. *J Biomed Sci* (2015) 22:85. doi:10.1186/s12929-015-0194-3
284. Flescher E, Ledbetter JA, Schieven GL, Vela-Roch N, Fossum D, Dang H, et al. Longitudinal exposure of human T lymphocytes to weak oxidative stress suppresses transmembrane and nuclear signal transduction. *J Immunol* (1994) 153(11):4880–9.
285. Yan Z, Garg SK, Banerjee R. Regulatory T cells interfere with glutathione metabolism in dendritic cells and T cells. *J Biol Chem* (2010) 285(53):41525–32. doi:10.1074/jbc.M110.189944
286. Gelderman KA, Hultqvist M, Pizzolla A, Zhao M, Nandakumar KS, Mattsson R, et al. Macrophages suppress T cell responses and arthritis development in mice by producing reactive oxygen species. *J Clin Invest* (2007) 117(10):3020–8. doi:10.1172/JCI31935

287. Kraaij MD, Savage ND, van der Kooij SW, Koekkoek K, Wang J, van den Berg JM, et al. Induction of regulatory T cells by macrophages is dependent on production of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) 107(41): 17686–91. doi:10.1073/pnas.1012016107).
288. De la Fuente M, Miquel J. An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr Pharm Des* (2009) 15(26):3003–26. doi:10.2174/138161209789058110).
289. Hydrogen peroxide as a potential mediator of the transcriptional regulation of heparan sulphate biosynthesis in keratinocytes Fumiaki Nakayama, Akiko Hagiwara, Tetsuo Yamamoto, Makoto Akashi *Cell Mol Biol Lett*. 2008 Sep; 13(3): 475. Published online 2008 May 6
290. S Roth, W Dröge *Cell Immunol*, 108 (1987), pp. 417-424
291. *Radic Res* 1995 May;22(5):389-97.Redox regulation of programmed cell death in lymphocytes. T M Buttke¹, P A Sandstrom
292. *Nucleic Acids Res* 1992 Aug 11;20(15):3821-30. Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF-kappa B by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62 J R Matthews¹, N Wakasugi, J L Virelizier, J Yodoi, R T Hay
293. *Biol Chem*. 2008 May 2;283(18):11913-23. Inhibition of the human thioredoxin system. A molecular mechanism of mercury toxicity Cristina M L Carvalho¹, Eng-Hui Chew, Seyed Isaac Hashemy, Jun Lu, Arne Holmgren
294. J.R Matthews, N Wakasugi, J.L Virelizier, J Yodoi, R.T Hay *Nucleic Acids Res*, 20 (1992), pp. 3821-3830
295. *EMBO J* 1998 May 1;17(9):2596-606. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1 M Saitoh¹, H Nishitoh, M Fujii, K Takeda, K Tobiume, Y Sawada, M Kawabata, K Miyazono, H Ichijo
296. E Junn, S.H Han, J.Y Im, Y Yang, E.W Cho, H.D Um, D.K Kim, K.W Lee, P.LHan, S.G Rhe e, I Choi *J Immunol*, 164 (2000), pp. 6287-6295
297. N.H Bishopric, K.A Webster *Circ Res*, 90 (2002), pp. 1237-1239
298. *Chem* 2001 Nov 9;276(45):42565-74. Epub 2001 Sep 4. Functional analyses of two alternative isoforms of the transcription factor Pax-5 M Lowen¹, G Scott, P Zwollo
299. *Rev Immunol* 1997;15:351-69. Redox regulation of cellular activation H Nakamura¹, K Nakamura, J Yodoi
300. *Antioxid Redox Signal* Fall 2000;2(3):537-50. Redox aspects of Bcl-2 function D W Voehringer¹, R E Meyn
301. J Nilsson, O Söderberg, K Nilsson, A Rosén *Blood*, 95 (2000), pp. 1420-1426
302. *Cell* 1993 Oct 22;75(2):241-51. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis D M Hockenbery¹, Z N Oltvai, X M Yin, C L Milliman, S J Korsmeyer

303. *Sci Total Environ* 2018 Feb 15;615:150-160 .Epub 2017 Sep 29. High-throughput in-silico prediction of ionization equilibria for pharmacokinetic modeling Cory L Strobe¹, Kamel Mansouri², Harvey J Clewell 3rd³, James R Rabinowitz⁴, Caroline Stevens⁵, John F Wambaugh⁴
304. T Andoh, C.C Chiueh, P.B Choc *J Biol Chem*, 278 (2003), pp. 885-890
305. *Curr Opin Immunol* 2002 Apr;14(2):216-23. Transcriptional control of B-cell development Michael Schebesta¹, Barry Heavey, Meinrad Busslinger
306. *Mol Immunol* 2002 Jun;38(15):1161-6. DNA methylation dominates transcriptional silencing of Pax5 in terminally differentiated B cell lines Mikio Danbara¹, Kohzoh Kameyama, Masaaki Higashihara, Yohtaroh Takagaki
307. J.M Adams, S Cory *Trends Biochem Sci*, 26 (2001), pp. 61-66
308. S.J Korsmeyer, X.M Yin, Z.N Oltvai, D.J Veis-Novack, G.P Linette *Biochim Biophys Acta*, 1271 (1995), pp. 63-66

ARTICLE 1:

L'apport de l'analyse unicellulaire de la leucémie aiguë dans la stratégie thérapeutique.

Après plusieurs décennies durant lesquelles le traitement de la leucémie myéloblastique aiguë (LMA) se limitait à des variations autour d'un squelette de type aracytine + anthracycline, des thérapies ciblées sont apparues. Ces thérapies ciblées étaient d'abord basées sur des anticorps monoclonaux (anti-CD52 et plus récemment, par exemple, anti-CD123) puis sur des inhibiteurs spécifiques de certaines anomalies moléculaires (mutations IDh1 et IDH2, FLT3 par exemple). Quelle doit être la place de ces nouvelles options thérapeutiques compte tenu de l'hétérogénéité tumorale inhérente au diagnostic de la leucémie et de la dérive clonale dont ce type de tumeur est capable ? De nouvelles approches par l'analyse de cellules individuelles d'ARN ou d'ADN peuvent définir plus précisément l'hétérogénéité clonale et la dérive clonale, conduisant à un traitement personnalisé et variable dans le temps

TITLE: The contribution of single-cell analysis of acute leukemia in the therapeutic strategy.

Authors : Lamia Madaci^a, Julien Colle^{a,b}, Geoffroy Venton^{a,b}, Laure Farnault^{a,b}, Régis Costello^{a,b}

Lamia Madaci : PhD Student,
Régis Costello : University Professor, Hospital Practitioner,
Geoffroy Venton : Assistant Head of Clinic,
Laure Farnault : Hospital Practitioner,
Julien Colle : Assistant Head of Clinic.

a: Laboratoire TAGC/INSERM U1090 Parc Scientifique de Luminy case 928, 163, avenue de Luminy, 13288 MARSEILLE cedex 09

b : Service d'Hématologie et Thérapie Cellulaire, Hôpital La Conception, Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille, 147 boulevard Baille, 13005 Marseille.

For Correspondence: Pr Régis Costello, Service d'Hématologie, Hôpital La Conception, 147 boulevard Baille, 13005 Marseille.

Téléphone : 04 91 38 41 50 / 51
Fax : 04 91 38 41 54
Courriel : regis.costello@free.fr

Abstract; After several decades during which the treatment of acute myeloblastic leukemia (AML) was limited to variations around a skeleton of aracytin + anthracycline type, targeted therapies have appeared. These targeted therapies were first based on monoclonal antibodies (anti-CD52 and more recently, for example, anti-CD123) and then on specific inhibitors of certain molecular abnormalities (IDh1 and IDH2 mutations, FLT3 for example). What should be the place of these new therapeutic options in light of the tumor heterogeneity inherent to leukemia diagnosis and the clonal drift of which this type of tumor is capable? Novel approaches by RNA or DNA single cell analysis may more precisely define clonal heterogeneity and clonal drift, leading to a personalized and time variable treatment.

Keywords: acute myeloid leukemia, single cell, tumor heterogeneity, clonal evolution, drug resistance.

Introduction

After decades during which the treatment of acute myeloblastic leukemia (AML) was based on variants of the classic "7 + 3" aracytin/daunorubicin (apart from the specific treatment of AML3), progress in molecular biology in particular has made it possible to highlight numerous "drugable" mutations that have led to the notion of targeted therapies. If we consider the new marketing authorizations for drugs intended for AML, most of them belong to this class of targeted therapies: midostaurine and gilteritinib (anti-FLT3), enasidenib (anti-IDH2), ivosidenib (anti-IDH1), venetoclax (anti-BCL2), glasdegib (hedgehog inhibitor) for example. From a simple diagnostic and prognostic tool, the large-scale identification of molecular abnormalities in AMLs, made possible by the high throughput of new generation sequencing techniques (NGS), has made them therapeutic targets. But do the results obtained live up to our expectations? We will limit ourselves to taking as an example the results obtained by the inhibitors of FLT3, Hedgehog, IDH1/ IDH2 and BCL-2.

The results obtained by targeted therapies

We will try to differentiate and discuss separately the monotherapy trials, which will give us the most accurate information about how the drug works and why it fails, and the associations.

Inhibition of IDH1/IDH2. Recurrent mutations of the isocitrate dehydrogenase (IDH) enzymes IDH1 and IDH2 are present in 15% to 25% of AML cases. The normal enzyme allows the conversion of isocitrate to alpha-ketoglutarate (KG) which plays an important role in the regulation of oxidative stress. On the other hand, mutated IDH1/IDH2 enzymes will convert KG into R-2-hydroxyglutarate (2HG) which inhibits histone demethylation (one of the mechanisms involved in leukemogenesis, explaining the use of demethylating agents in these pathologies) by inhibiting JMJD2A and TET2. These mutations often occur in association with NPM1 and DNMT3 mutations; when associated with an NPM1 mutation, the prognosis is significantly improved. This notion of co-association of mutations is an important element to take into account, which may already begin to pose a problem in the concept of targeted therapy; which molecular anomaly should be targeted when there is an association? Certainly, it is possible to think that the solution comes from clinical trials. But in this case, given the multiple possible associations, it will be very difficult to include enough patients in a clinical trial to derive statistically valid results for each of the possible associations. In the Phase I trial of ivosidenib, an HDI1 inhibitor, a complete remission rate (CR) of almost 22% was achieved, but with a median duration of response of only 6.5 months and a median overall survival (OS) under 9 months, thus demonstrating rapid tumor escape mechanisms.[1;2] Stackable results were obtained with the H2DI inhibitor, enasidenib; a CR rate of almost 20% was achieved, but with a median duration of response under 6 months and a median OS again under 9 months. How can we try to explain these results, which are certainly interesting but insufficient in view of the brevity of the response and the absence of a significant cure rate? Is it a lack of efficacy of the drug in eradicating HDI mutated cells? The ivosidenid allows the disappearance of the IDH1 mutation in 21% of cases, with a median response rate that in this case increases to more than 15 months, without being able to attain AML cure because the ultimately mutated clones reappear. Nevertheless, the notion of negativity of minimal residual disease (MRD) detected in molecular biology must be evaluated with caution, as it seems that a number of MRD-neg patients present a contingent of mutant HDI1 cells only detected by specific antibodies.[3] The simplest hypothesis consists in

considering that a fraction of IDH1 mutated cells are not sensitive to the drug, by potentially diverse mechanisms that could possibly be identified in the total population or by more sophisticated "single cell" analysis techniques. Certain mechanisms potentially leading the IDH2 inhibitor enasidenib to induce its own inactivation can be hypothesized. Enasidenib at clinically useful doses induces up to a three-fold increase in cytochrome CYP3A.[4] CYP3A is involved in N-dealkylation,[5] this mechanism being in humans involved in the degradation of enasidenib.[6] The article by Quek et al. [7] analyzes the clonal evolution of patients treated with enasidenib. Firstly, the hypothesis of new mutations not sensitive to enasidenib, as observed with tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia, is not retained by the authors for the patients studied in the article because no new IDH2 mutations were identified in this population. This mechanism has nevertheless already been described to explain relapses/resistance to enasidenib, whether trans or cis dimer-interface mutations.[8] The mechanism of action retained for enasidenib is not the eradication of the mutant IDH2 clones but the terminal differentiation of part of the mutant clones, allowing a resumption of normal hematopoiesis. In addition, other clones with mutations other than IDH2 contribute to the relapse, either because they exist at a level undetectable at the time of diagnosis of the disease, or by their "de novo" appearance. [7]. Indeed, IDH mutations are considered as foundational but are often associated with other mutations such as DNMT3, SRSF2, NPM1, ASXL1 and RUNX1 in particular, which may contribute to relapse through clonal or sub-clonal evolutionary mechanisms. Nevertheless, DiNardo's seminal paper [1] did not find a correlation between pre-existing single gene mutations, including NRAS, and the response rate, but in refractory patients an enrichment of mutations involving the metabolic pathway of tyrosine kinase receptors was observed. In addition, the mean number of mutations was 1.8/patient in the responder group vs. 2.6/patient in the non-responder group, thus supporting escape mechanisms related to mutations not sensitive to IDH1 inhibition. Can these results be improved by a combined approach? Dinardo et al. (Abstract 560, ASH Annual Meeting 2018) treated 154 patients with IDH1 or IDH2 mutations with a classic 3 + 7 regimen (daunorubicin or idarubicin) combined with ivosidenib or enasidenib, with consolidation and continuation of IDH inhibitors. The overall response rate (CR + CRi) was 80%, with a CR rate of 91% for patients with primary AMLs, and 53% for patients with secondary AMLs. Several other studies are in progress to test the therapeutic gain of a combination of chemotherapy/demethylating agents with anti-IDH, the results of which are pending. (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03173248>, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02677922>).

Hedgehog inhibition: glasdegib. This is an oral "hedgehog pathway" inhibitor targeting the "smoothened" compound (SMO), which is abnormally present in AMLs, and which induces signaling via the "glioma-associated oncogene homolog" (GLI1). Numerous in vitro studies underline the potential value of inhibiting this signaling pathway in AMLs, notably through a chemo-sensitizing effect on leukemic stem cells (LSCs) [9] known to be resistant to conventional drugs.[10] In a Phase I trial of glasdegib, 28 patients with AML were treated with glasdegib.[11] The results, although interesting, were not spectacular: an effect was observed in 16 of the 28 patients, with 1 CR, 4 PRs with incomplete hematological reconstitution, 4 patients with a minor response and 7 patients with stable disease. In fact, many other studies have investigated the combination of glasdegib / chemotherapy. The study by Cortes et al. compares low-dose cytarabine to cytarabine / glasdegib in patients with AML or high-risk MDS.[12] The CR rate was 17% in the cytarabine / glasdegib arm vs. 2.3% in the cytarabine arm alone, with an OS of 8.8 months vs. 4.9 months respectively. In the absence of a randomized trial, it nevertheless appears that by analyzing the literature data and by simulating treatment comparisons, the glasdegib/cytarabine combination is superior to azacytidine or decitabine treatments.[13] In another single-arm trial, glasdegib was combined

with conventional "7 + 3" cytarabine + daunorubicin chemotherapy, with a CR rate of 46.4%, in a sample of patients primarily over 55 years of age.[14] This CR rate is not particularly favourable, the authors having set a goal of exceeding a CR rate of 54%, but the observation of a plateau of relapse-free survival (RFS) at 24 months for about 40% of patients suggests a potentially eradicating effect on LSCs. However, it should be noted that in this study no correlation between clinical response and mutations in the 12 genes analyzed (CEBPA, DNMT3A, FLT3, FLT3-ITD, IDH1, IDH2, KIT, KRAS, NPM1, NRAS, RUNX1, TET2, WT1) could be demonstrated. In MDS refractory to hypomethylating agents, glasdegib monotherapy gave a response in only 6% of patients (2 out of 35), with nevertheless 56% of patients showing stable disease for an OS of these patients of 20.6 months.[15]

Inhibition of FLT3 (midostaurin, gilteritinib): FLT3 is a class III receptor tyrosine kinase, and is the most common mutation found in AMLs, justifying the interest of targeted therapies that would be applicable in about 30% of patients (for review,[16]). The princeps article of Stone et al.[17], in FLT3 mutated patients, compares standard daunorubicin plus cytarabine induction and consolidation therapy with high-dose cytarabine with or without midostaurine. The results in terms of CR are not significant, 59% in the midostaurine group vs. 54% in the placebo group, but with significantly improved OS and EFS in the midostaurine arm. It should be noted that midostaurin has several targets outside FLT3: c-kit, VEGFR, PDGFR and FGFR in particular, potentially mutated in some AMLs, which could suggest in some cases an increased efficacy due to the existence of several targets. Conversely, the hedgehog pathway seems to be more often involved in the proliferation of FLT3 mutated AMLs,[18] and the double inhibition FLT3/Hhh could improve the results obtained with midostaurin. Several other FLT3 inhibitors have been developed, among the most promising being gilteritinib, an inhibitor mainly of FLT3, more incidentally of c-Kit, but also of AXL tyrosine kinase, the blocking of the latter reinforcing the inhibition of FLT3-ITD. Gilteritinib showed efficacy in relapsed/refractory AMLs in the study by Perl et al.[19] The percentage of CR patients with complete or partial hematological recovery was 34% in the gilteritinib group vs. 15.3% in the chemotherapy group, with 21.1% and 10.5% CR respectively. While the EFS was 2.8 months in the gilteritinib group vs. 0.7 months in the chemotherapy arm, the survival curves converge at 24 months and there was no survival plateau, clearly demonstrating that gilteritinib monotherapy is an interesting molecule with limited results. Several combination trials of anti-FLT3 antibodies with azacytidine have been conducted (for review, please see, [20]) without any real benefit having been demonstrated. The mechanisms of resistance to FLT3 inhibitors may be present from the outset in the leukemic population or acquired through selection phenomena; among the most frequently mentioned mechanisms are mutations at the inhibitor binding site (residue D835 in particular), overexpression of FLT3, or use of alternative signalling pathways (NRAS mutations for example).

Inhibition of BCL2: venetoclax. For a long time, the simplistic view of an apoptosis defect predominant in lymphoid hematopathies (chronic lymphocytic leukemia [CLL] type) and an increase in proliferation as the hallmark of AMLs has prevailed, with the known successes in the use of the BCL2 inhibitor venetoclax in CLL. Nevertheless, increased BCL-2 expression has been shown to be a poor prognostic factor in AMLs.[21] BCL-2 interferes with pro-apoptotic factors such as BAX, preventing mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) and thus blocking apoptosis. In a Phase II trial,[22] a response to the venetoclax inhibitor was demonstrated with an ORR of 19%, with a CR rate of 6% and 13% CRi, with significantly more favorable response rates in IDH1/2 mutated patients with 33% CR/CRi. Conversely, FLT3-ITD and PTPN11 mutations appear to confer resistance to venetoclax.[23] This response to BCL2 inhibition is undeniably interesting but insufficient. The addition of aracytine significantly improves the results with 48% CR/CRi for venetoclax/cytarabine vs. 13% for cytarabine alone, without however resulting in a significant increase in OS (7.2 months for venetoclax/cytarabine vs. 4.1 months for cytarabine alone).[24] Association with demethylating agents appears more promising with CR/CRi rates of 73% in the

azacytidine/venetoclax arm, and median OS not achieved in this arm but > 17.5 months,[25] defining a new standard of treatment for AML in elderly subjects (>65 years old) ineligible for intensive chemotherapy.[26] The pathophysiological basis of the efficacy of this association seems to be partly due to the induction of the BH3-only protein NOXA.[27] Resistance to these therapies is a very rapid dynamic phenomenon with, in particular, gains in FLT3-ITD and loss of PT53 being at the origin of resistance to both venetoclax and chemotherapy.[28] Interestingly, one publication evaluated the response to the venetoclax/azacytidine combination according to the French-American-British classification based on blast morphology, which defines among others the AML5 type as monocytic, which turns out to be refractory in 62% of cases.[29] In the same article, the analysis of patients in relapse shows a drift towards a predominantly monocytic profile. This primitive resistance of FAB-AML5 and monocytic selection is explained by the loss of BCL2 from this subpopulation, in correlation with the maturation towards the monocytic phenotype.

In conclusion, the targeted therapies notably used in monotherapies give interesting results without being spectacular, including little or no "cure", i.e. sustainable CR. The mechanisms evoked are obviously multiple, and linked both to the state of the tumor at the beginning of treatment but also to its evolution under treatment, under the possible pressure of targeted therapy +/- conventional chemotherapy +/- adoptive immunotherapy +/- immunity developed by the patient. These different mechanisms can be expressed in different forms. The selection pressure may allow the emergence of clones presenting mutations insensitive to the targeted therapy either appearing *de novo* by mutation or pre-existing in small numbers and gradually replacing the sensitive cells, the latter hypothesis being favored in mathematical models, at least in CLL in the context of treatment with a BTK inhibitor.[30] They may also be clones or cell populations that are capable of using several "rescue" pathways on the same metabolic pathway or the use of parallel metabolic pathways. According to these various mechanisms, what means do we have at our disposal to best adapt the treatment to each patient and therefore especially to each tumor? The "tumor identity card" of AMLs as it is carried out today includes classical cytology data (morphology), flow cytometry phenotyping (more directly useful in ALLs than in AMLs) which allows us to analyze combinatorial surface markers and to define a substantial number of sub-populations, and molecular biology data which allow us to identify, among other things, a rather large (and growing) panel of mutations. Unlike "morphological cytology" and flow cytometry, which analyse AMLs cell by cell, mutation search techniques are usually performed on general populations and give quantitative or semi-quantitative data without identifying, as flow cytometry would do, sub-populations with different mutation profiles. Are these data sufficient to define the best treatment for each patient? To guide it, certainly, but the analysis nevertheless seems insufficient. Let's take a few examples of tumors at diagnosis (we will evaluate later the evolution during treatment). Let's imagine an AML for which the molecular diagnosis finds an NPM-1 mutation, whose prognosis is modified by the presence of competing mutations of FLT3, DNMT3, NRAS, IDH or PTPN11 for example. The questions that can be asked in this case are multiple; 1) at what level of leukemic differentiation are the mutations ("stem cells" vs. cells undergoing differentiation), 2) at what level of the clonal hierarchy ("truncal mutations" vs. "branches") are these abnormalities located, 3) at what point are the mutated genes transcribed and in what dynamics (residual RNA or RNA in constant supply)? 4) Are the detected abnormalities grouped on the same cell or are they observed on different cells? (being able to describe co-expression for a unique cell). If, for example, several mutations such as DNMT3, SRSF2, NPM1, ASXL1 and RUNX are found, unless it is considered that these mutations involve all cells, it is impossible to know if the same cell has two or more mutations. At most, if we consider that the mutations are randomly distributed, could we evaluate the co-occurrences by a calculation according to Poisson's mathematical law. Each of

these combinations of expression can lead to a different evolution of AML under treatment, and can be identified in the framework of new technologies called "single cell". Let's start by evaluating, in a non-exhaustive way, the different techniques at our disposal to answer these questions, with an emphasis on the so-called "single cell" approaches (for a comprehensive review,[31]) which are those that allow us to be as close as possible to the questions asked. Cell-by-cell analysis is the hallmark of flow cytometry. While this technique has evolved considerably in recent years, the number of labeled antibodies that can be used for a single sample is limited by the autofluorescence of the cells and by the fluorescent dye spectral overlap. While some instruments can analyze up to 50 parameters simultaneously, most recent machines do not exceed 20 fluorescence detectors.[32] Mass spectrometry techniques make it possible to increase the number of parameters analyzed, up to 120 in the most recent publications, which have improved our knowledge of certain rare populations such as LSCs.[33;34] Even the analysis of the expression of 120 molecules is nevertheless far from the thousands of genes expressed by each cell, whose expression can be evaluated by "single cell" techniques.

The single cell RNAseq technique makes it possible to determine the expression, in a semi-quantitative way, of all the RNAs of each cell, on samples of about tens of thousands of cells. Computer analysis of the data enables cell populations to be determined according to the degree of similarity of the gene expression pattern. Given the cost of this type of experiment but also the possible variations from one experiment to another, techniques have been developed to allow several different samples to be analyzed simultaneously, for example with cell hashing. This technique uses antibodies that recognize ubiquitous antigens, the addition of a different barcode to each antibody allows, after independent cell labelling, to recognize each cell of each sample once they have been mixed.[35] Several different samples (4 to 8 for example) can be analyzed at the same time, with the limitation that the number of cells analyzed per sample and/or the depth of the reading (number of reads) can be reduced. The single cell technique can also be associated with the direct recognition of cell subpopulations by the Cellular Indexing of Transcriptomic and Epitopes by sequencing (CITE-seq) technique.[36], always on the principle of labelling by an antibody coupled to a barcode. Other techniques allow the analysis of genomic sequences, chromatin accessibility, DNA methylation, histones, chromosome conformation. These different techniques can be combined for multimodal analyses.[31] The application of these techniques to AMLs has led to interesting results with numerous physiopathological, prognostic and probably therapeutic benefits.

The single-cell approach allows first of all to better define the biology and the heterogeneity of the different blast populations in AMLs (for review,[37]) and, more generally, normal and leukemia hematopoiesis (for the review, [38]).

Leukemia stem cell

The very notion of LSC is sometimes discussed, nevertheless this population is considered to be at least partly contained the CD34+CD38- population. It is on this phenotype that the study by Won et al. was based [39], which does not use single cell molecular analysis but classical single cell culture techniques. By comparing the LSCs to the CD34+CD38+ counterpart, it is shown (on a reduced panel of 84 genes) that there is a decrease in the expression of 27 genes involved in cell activation pathways, in particular concerning the TGF, Wnt, FGF, Hedgehog Notch, IL6ST and LIFR super-families. Another explanation for the quiescence of these LSCs is the decrease in mitochondrial DNA (mtDNA) copy number, which, unprotected by histones and closer to the Reactive Oxygen Species (ROS) generation site, is potentially more susceptible to mutations. The article by Sachs et al.[40] identifies in a

single cell technique a LSCs signature in a mouse model of leukemia that is compared to the transcriptomic profile of CD34+CD38- stem cells from healthy donors. The similarities of expression in murine LSCs and normal stem cells lead to the hypothesis that the normal transcriptional program is also used for the development of human LSCs. Moreover, by comparing the expression of a set of genes in the 10% of cells expressing them most on normal stem cells vs. LSCs, a signature of 9 LSCs "specific" genes was demonstrated (CD69, S100A4, MYB, ADA, MRI1, CKS2, H2AFZ, BCL2A1D, CD36). Finally, the single cell study showed that in LSCs as well as in HSCs, the proliferation and self-renewal functions are separated, possibly explaining the failures of anti-proliferative therapies.[40]

Ultimately, the classical single cell culture and transcriptomic approach provides us with additional data on the biology of LSCs, with both a decrease in the expression of activation pathways, increased expression of genes involved in self-renewal, separation between proliferation and self-renewal functions, and resistance to chemotherapies while providing possible therapeutic targets aimed at eradicating LSCs (CD36 or MYB for example).

Prognostic and evolutionary value

A certain number of AMLs occur during the evolution of an MDS, the evolutionary risk being evaluated by the R-IPSS score, which essentially takes into account cytopenias, the percentage of blasts and cytogenetic abnormalities, bearing in mind that NGS techniques have made it possible to highlight the prognostic role of certain mutations.[41] Intuitively and according to these models, which weight heavily in their scores the percentage of blasts to determine the chances of transformation into AML, the leukemic evolution would be based on these blasts existing at the diagnosis of MDS, whose expansion would lead to AML. The single cell study challenges this notion by proposing a non-linear progression model. Indeed, the study of a series of patients whose MDS has evolved towards AML showed that the majority clone at the AML stage did not come from blasts identified at the MDS stage but from a subclone only detectable in stem cells at the pre-MDS or MDS stage.[42] At the time of targeted therapies, this notion is of great interest and also explains certain disillusion. Indeed, molecular biology analysis on total population, even with a great depth of reading, will not be able to identify the population really responsible for the leukemic transformation, dooming to failure the attempt to block the leukemic evolution by a targeted therapy based on these global data. Only the early identification of subclones of stem cells particularly apt to develop (mutations known to be of unfavorable prognosis, expression of chemotherapy-resistance genes, etc.) will be able to effectively guide the therapeutic strategy. The single cell mass spectrometry study of Levine et al.[43] consisted in the analysis of 31 proteins under 18 cell stimulation conditions on 15 million cells from 31 AML patients. While in hematopoietic cells from healthy donors the classical surface markers of stem cells correlate with an activation profile, this is not the case in AML samples. Indeed, when the surface phenotype is confronted with the expression and activation profile of functionally and clinically relevant pathways in AMLs, it appears that the profiles are often discordant, leading to the definition of Surface-Defined Primitive Cells (SDPCs) versus Inferred Functionally Primitive Cells (IFPCs). Interestingly, the IFPCs profile has been shown to have a better predictive value for patient survival than the SDPCs profile.

Drugs

Gilteritinib is a FLT3 inhibitor, effective but not curative in AMLs. The possible emergence of new mutations in relapsed patients has been shown in the total population. The work of McMahan et al.[44] analyzed by a single cell DNA sequencing technique the samples of 4 patients with relapsed AML with RAS mutation. This analysis showed that in all 4 cases the RAS mutation occurred in the same clonal population that had the FLT3 mutation, suggesting that it is the RAS mutation that confers resistance to gilteritinib. In addition,

single-cell analysis of the presence of mutations showed that out of 3 AMLs analyzed at diagnosis and relapse, in 2 patients a mutated NRAS clone pre-existed but appeared during treatment for the 3rd patient. In addition to these double mutant FLT3/NRAS clones, another patient had a pre-existing FLT3-WT/NRAS-WT subclone containing the IDH1 and SSF3B1 mutations, which had expanded under gilteritinib.[44] This small series already shows the interest of the single cell approach, which allows highlighting evolutionary patterns of relapse/resistance very different from patient to patient and showing the presence of subclones appearing under gilteritinib or pre-existing, and requiring another approach than the inhibition of FLT3 to allow their eradication. For another FLT3 inhibitor, the single cell analysis showed the existence of polyclonal populations resistant to this drug in patients who relapsed after treatment with quizartinib, with both on- and of target mutations.[45]

The single-cell approach also allows a better understanding of the kinetics and pathophysiology of relapses occurring after allografting. Indeed, the single-cell study brings an unequalled precision of analysis by precisely evaluating the post-allograft chimaerism but also by being able to detect and quantify the different leukemic clones according to their phenotypes/mutations and especially to define the co-occurrences of these mutations, which is only possible indirectly and not very precisely by bulk analyses.[46] By this technique two types of relapse could be identified, one based on the development of a clone with a pre-existing mutation and the other on the emergence of a clonal mutation occurring *de novo*.

Residual disease

The single cell approach has an interest in monitoring residual disease (MRD). The paper by Pellegrino et al.[47] analyzes the evolution of the mutations detected at diagnosis, in CR and during relapse on just over 4000 cells at each stage. At the CR stage, the patient had only 10 mutated cells (7 DNMT3A and 3 TP53) out of the 4384 genotyped cells, with reappearance of these populations during relapse.[47] Furthermore, the relapse analysis showed a significant expansion of the triple-mutant population H2DI/NRAS/ASXL1, demonstrating that any approach that targets only one of the mutations would be doomed to failure. The paper by Ediriwickrema et al.[48] analyzed 14 patients, 10 without relapse and 4 with relapse, with a mean of 8177 cells analyzed per point. The analysis of the CR patients showed the existence of mutated cells in 8 of the 10 patients who will relapse and in 3 of the 4 patients in whom no relapse could be observed, the difference not being significant in this small sample size. On the other hand, the number of mutations co-occurring at diagnosis, i.e. present in the same cell, was 2 in patients who relapsed vs. 1 in patients in whom the CR maintained. The small number of patients tested makes any hypothesis risky, but nevertheless this type of data reinforces the interest of the single cell approach since it is not the "quantity" of mutations that seems important but rather the type of cell distribution, several mutations in the same cell appearing more deleterious than the same mutations spread over different clones.

Physiopathology

The single cell approach allows the study of the pre-leukemic stages of stem cells and demonstrates their heterogeneity. Indeed, while in some patients all stem cells present at least one mutation-driver and are therefore pre-leukemic (p-HSC), in other cases this population of p-HSC is undetectable, and mutations are only found at the leukemic blast stage.[49] As stated by the authors, the observed decreased accessibility at HOX transcription factor motifs might mediate the observed retention of stem cell immunophenotype and thus the self-renewal properties of the p-HSC subpopulation. The generation of phylogenetic trees concerning AMLs with NPM1 mutation showed that this mutation, considered as a rather favorable prognosis, was not present in p-HSC, the latter presenting different driver

mutations.[50] Nevertheless, when these different p-HSC clones are transplanted into mice, they develop a dominant mutated NPM1 clone 9 times out of 10, although the basic driver mutations were different and both in cases where the NPM1 clone was minor or dominant in the original AML. These data suggest that the NPM1 mutation can only be a powerful driver mutation if it occurs in cells with increased self-renewal capacities acquired through DNMT3A or TET2 mutations for example, but that in this context of pre-existing driver mutations the presence of the NPM1 mutation gives a decisive selective advantage for cells with the association of two or more mutations.

The single cell approach is decisive for the evaluation of tumor heterogeneity. The work of van Galen et al.[51] defines at least 6 tumor cell types (represented by a significant number of cells) according to their transcriptional signature: HSC-like, progenitor-like, GMP-like, promonocyte-like, monocyte-like and cDC-like. These cell subtypes resemble 6 of the 15 cell types identified in normal bone marrow samples. But heterogeneity is also reflected by the different mutations detected in the subpopulations. Indeed, if compared to solid tumors the number of mutations is low in AMLs, these mutations add a level of heterogeneity by the percentage of affected cells (from 1.8% to 52%) but on the other hand the associations between them of these mutations are at fairly stable levels of leukemia to leukemia: 1 single mutation in 88 to 98% of the cells, 2 mutations in 1.6 to 12% of the cells, 3 mutations between 0 and 0.29% of the cells, and practically no cells with 4 mutations (only 1 cell out of 8200 mutant cells on only one of the 4 AMLs analyzed).[52] Moreover, this notion may not be extensible to all types of AMLs, with the co-occurrence of PTPRT, CAND1 and DOCK6 mutations at least in one case of CBL MLAs with inv(16).[53] Finally, cell-by-cell analysis via pre-sorting allows the frequency of heterozygous versus homozygous mutations to be determined with greater precision than extrapolations from bulk data,[54] results that could be more easily obtained with the new techniques of single cell analysis in total population. Finally, single-cell genomics have recently improved our understanding of epistasis among high-frequency mutation.[55] In myeloid neoplasms, mutations in RNA splicing factors most often (>99% of cases) occur in a mutually exclusive manner. In less than 1% of patients 2 or more splicing factor mutations are detected. The common hypothesis to explain this phenomenon is that the concurrent mutation of 2 or more RNA splicing factors is lethal for the cell. As a consequence, the very rare co-occurrence of RNA splicing factors should involve different subclones. Nonetheless, single-cell analysis has revealed that this co-occurrence is observed in half cases in the same individual cell, but usually with rare amino acid substitutions with reduced effect on RNA splicing, thus explaining the possibility of coexistence in the same cell.

Discussion

The progress made in the biological analysis of AMLs has been impressive in recent years, with the virtual abandonment of the French American British morphological classification in favor of a molecular "identity card". This approach has made it possible to highlight numerous mutations with prognostic value but also and perhaps above all those that are "drugable", such as the FLT3 mutations as well as IDH1 and IDH2. Compared to solid tumors, the number of mutations found in a given AML is much lower. These two notions have led to the belief that so-called "targeted therapies" are the ultimate weapon in the treatment of AMLs. Nevertheless, there are many objections to this concept, notably the observations resulting from the various "single cell" techniques that allow the study of transcribed RNA but also of the DNA sequences themselves on a cell-by-cell basis. There are many lessons to be learned from these techniques, all pointing to the extreme heterogeneity of leukemic blasts. This heterogeneity could be described as "spatio-temporal". Spatial heterogeneity, in the sense of t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) analysis, is

an approach that reduces the dimensionality of blast cells high-dimensional data and enables the data to be visualized in two-dimensional space. It is easy to see by this type of visualization, which groups the cells by the similarity of their gene expression profiles, that within a blast population that could be considered homogeneous according to the flow cytometry data, there are in fact many sub-populations. Indeed, this type of representation rarely shows very narrow population spots. Moreover, the analysis of the expression of certain genes, for example resistance to chemotherapy (personal data), shows a significant dispersion at the level of the blast population. The very notion of LSC, defined on the CD34+CD38- phenotype (with all the variants of phenotypic definition) does not resist the single cell analysis which in fine defines various very distinct populations but having in common the essential characteristic of LSCs, namely the capacities of self-renewal. As for the mutations detected by bulk techniques, single cell analysis shows that they are not present in all tumor cells but only in sub-populations of variable size. Moreover, some drugable mutations may not be present at the LSC population level. The notion of "spatial" heterogeneity should be complemented by the notion of "temporal" heterogeneity. Indeed if compared to solid tumors, AMLs present a much smaller number of mutations, it should be noted that leukemias often have a much higher rate of proliferation. In fact, the distribution of sub-populations and mutations is therefore likely to vary very rapidly, either spontaneously, under the pressure of the patient's possible immune response, or under the pressure of conventional chemotherapy drugs or targeted therapies. Consequently, it is difficult to develop a therapeutic strategy that would not take into account the initial heterogeneity of AMLs, nor the possibilities of clonal drift over time, i.e the spatio-temporal heterogeneity of AML blasts and LSCs. This is evidenced by the clinical response that is certainly effective but generally short-lived when targeted therapies are used as monotherapy. The linear evolutionary trajectories model consists in the replacement of a clone-present by a clone derived from itself, when a new mutation or epigenetic modifications occur, giving it a selective advantage through a higher proliferation rate or a greater resistance to the immune response and/or chemotherapies. While this type of evolution may exist, the branched evolutionary model gives rise to divergent clonal populations from the same parent clone. These populations will also eventually compete with each other, leading to the disappearance of one of the branches or possibly to a situation of equilibrium. Whatever the therapeutic approach, it is also necessary to take into account, except in the context of chemotherapy immediately preceding an allogeneic HSC transplant, the expected toxicity on progenitors and normal stem cells, guarantors of post-chemotherapy hematological reconstitution. What are the steps that should guide our reflection? We have several therapeutic classes at our disposal:

1) conventional chemotherapy drugs, which intervene at the DNA level to prevent cell division (aracytin and anthracyclines for example in AMLs), 2) anti-metabolic drugs such as methotrexate, 3) demethylating agents, 4) inhibitors of metabolic pathways based on peculiarities of tumour blasts, 5) therapies targeted to well-defined abnormalities, 6) immunotherapy. How can we try to make the most of this armamentarium, impressive at least on paper but much less in practice given the CR rates and median survival rates that we obtain with current therapies, apart from acute promyelocytic leukemia, a pathology in which very specific therapies (all-trans retinoic acid and arsenic trioxide) give remarkable results. We postulate as a working hypothesis; 1) that it is necessary to know individually, i.e. cell by cell, the potential for proliferation, self-renewal and resistance to the different treatments of leukemic cells, in addition to knowledge of populations with a "drugable" mutation; 2) that this initial knowledge is not sufficient and that it is necessary to repeat this analysis after each therapeutic assault.

Let's take a few simplified examples to assess the value of such a strategy. It is necessary to include in the analysis the expression of resistance genes to therapeutics, whether

chemotherapy or immunotherapy, and I will take as examples P-gp, MRP, GST, Bcl-2, TGF β , Gal-9 and CLIP (for review, [56]) or NKG2DLs. Glycoprotein P or P-gp/MDR1, is a positive ion pump that removes intracellular drugs by exporting them out of the cells, thus reducing their intracellular drug concentration and therefore their efficacy. [57]. P-gp/MDR1 is involved in resistance to major AMLs drugs, of which they still form the backbone, namely daunorubicin, mitoxantrone or aracytin.[58] The Multidrug Resistance-associated Protein (MRP1) is a glutathione transport pump capable of identifying and transporting glutathione coupled substrates, including anti-neoplastic drugs.[59] Its ubiquitous expression would not make it a target for a drug that inhibits its effect, whereas it confers resistance again to drugs used in leukemia, such as doxorubicin, etoposide and vincristine.[60] Glutathione S-transferase or GST is an enzyme that catalyzes the binding of anti-cancer drugs to glutathione to directly inactivate drug activity; it also inhibits the effect of these drugs on DNA. Among other properties, it inhibits the effects of alkylating agents, anthracyclines and platinum salts, and is involved in the chemoresistance of AMLs.[61] Bcl2 (B-cell Lymphoma 2) is a protein that promotes cell survival by inhibiting cell death by apoptosis. Venetoclax is a "BH-3 mimetic" antagonist, used in AMLs but for which there is an escape mechanism by two other anti-apoptotic proteins, namely BCL-XL and MCL-1. The knowledge of the exact representation in leukemic blasts could guide the treatment by indicating a priori an inefficiency of venetoclax in monotherapy and therefore a need for a blocking combination of BCL-XL is MCL-1.[62] The growth factor TGF β (transforming growth factor beta) is a cytokine produced by tumors and immune cells. It is one of the cytokines involved in tumor escape to the immune system, it induces the anergy of NK cells.[63] (down-regulation of CD48) and of cytotoxic lymphocytes [64]. The expression of Galectin 9 (Gal-9), which is a negative co-stimulatory ligand, induces the death of helper 1 and cytotoxic T lymphocytes in AML.[65] The peptide associated with the invariant HLA class II chain (CLIP) on the surface of leukemic cells could serve as a tumor escape mechanism in AML by disrupting CD4 T activation.[66] It is interesting to note that resistance to immunotherapy could be an intrinsic property of LSCs [10], among other things because of the lack of expression of NKG2D ligands which seems to be part of the phenotype, admittedly discussed, of LSCs. NKG2D is an activating receptor found on the surface on various immune cells, including NK cells, which helps to facilitate cytotoxic and cytokine responses against target cells expressing its ligands. Low or absent expression of NK cell-activating receptor ligands (NKG2DLs) of the MIC and ULBP families, as well as secretion of soluble NKG2DLs in AML, is well established as a strategy for immune escape employed by leukemia cells here provide the first demonstration that the absence of NKG2DLs is a defining characteristic of LSCs and that PARP1 inhibition can restore NKG2DL expression thus sensitivity to NK cell immune surveillance. Interestingly, the previously reported stimuli to promote NKG2DL expression in leukemia cells, such as all-trans retinoic acid (ATRA), valproic acid, and azacitidine, are not able to enhance NKG2DL expression by LSCs.[67] Of note, all these anomalies can be focused on single cells, as shown in Fig.1 showing the co-expression of most previous discussed tumor resistance in two AML samples (L Madaci, personal data) in a small percentage of blasts (Fig. 1, panel A and B) and even in a very discrete but nonetheless significant percentage of LSC (Fig. 1, panel C and D). This co-expression could explain the relapses, unless we are able to develop a therapeutic pathway to overcome this "pan-resistance" to treatment.

First of all, the analysis of the characteristics of leukemia will have to focus on the cells that are most important for the long-term effectiveness of the treatment, i.e. to avoid relapses and talk about cure. It is therefore necessary to replace the analysis of the global expression of the usual prognostic markers by the determination of their expression on LSCs, a population which is certainly difficult to define but which we could define here as blasts not

expressing NKG2DL ligands, thus able to evade at least the innate immune response.[67] If this NKG2DL-negative population does not present mechanisms of resistance to chemotherapy treatment, and even if abnormalities considered of poor prognosis are detected in more mature blasts, this leukemia may be considered of good prognosis (Fig.2). The advantage of this LSCs analysis is that the notion of allelic load and/or quantification of the detected abnormalities is less important, the important being not the quantitative criteria but the qualitative one, i.e. the number of blasts presenting the abnormality is less important than the determination of which blasts have this abnormality, "mature" blasts vs ICL. This approach should allow us to prioritize the abnormalities that appear the earliest in the leukemia phylogenetic tree: since NGS techniques are determining more and more "drugable" mutations, it will become necessary to prioritize the use of these drugs whose toxicities will not always allow them to be associated in doublets or triplets to cover all the mutations detected. Single-cell analysis will also make it possible to adapt the most useful sequences during treatment according to the fluctuations observed in the blast populations of the residual disease, by starting treatment with conventional chemotherapy, which will make it possible to reduce tumour heterogeneity before using targeted therapies (Fig. 3). In the difficult case where one or more mechanisms of resistance to conventional drugs exist in the LSCs (Fig. 4), the addition of sensitizing drugs will be used when possible, but this is not always the case (e.g. overexpression of MRP1, too ubiquitous to be targeted). In this case, classical chemotherapy will have a "debulking" role, allowing in a certain number of cases to reduce, as in the previous case, tumor heterogeneity and then allow the use of targeted therapies. These targeted therapies, if the target is present early in the leukemic phylogeny, will be able to cure leukemia but, most probably, it will be necessary to complete the treatment with either passive or active immunotherapy depending on the abnormalities detected in the leukemic blasts (i.e. expression of a protective molecule against the immune response). In this respect, single cell analysis in total population allows to analyze not only leukemia but also part of its immunological environment, i.e. T lymphocytes, NK cells and even dendritic cell populations, which could possibly improve the positioning of the different immunotherapy approaches, i.e. monoclonal antibodies, cytokines, allograft, T-CAR cells for example.

Reference List

- (1) DiNardo CD, Stein EM, de BS, Roboz GJ, Altman JK, Mims AS, et al. Durable Remissions with Ivosidenib in IDH1-Mutated Relapsed or Refractory AML. *N Engl J Med* 2018 Jun 21;378(25):2386-98.
- (2) DiNardo CD. Ivosidenib in IDH1-Mutated Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2018 Sep 20;379(12):1186.
- (3) Kurt H, Bueso-Ramos CE, Khoury JD, Routbort MJ, Kanagal-Shamanna R, Patel UV, et al. Characterization of IDH1 p.R132H Mutant Clones Using Mutation-specific Antibody in Myeloid Neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2018 May;42(5):569-77.
- (4) Li Y, Connarn JN, Chen J, Tong Z, Palmisano M, Zhou S. Modeling and simulation of the endogenous CYP3A induction marker 4beta-hydroxycholesterol during enasidenib treatment. *Clin Pharmacol* 2019;11:39-50.
- (5) Coutts RT, Su P, Baker GB. Involvement of CYP2D6, CYP3A4, and other cytochrome P-450 isozymes in N-dealkylation reactions. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1994 Aug;31(4):177-86.
- (6) Tong Z, Atsriku C, Yerramilli U, Wang X, Li Y, Reyes J, et al. Absorption, distribution, metabolism and excretion of an isocitrate dehydrogenase-2 inhibitor enasidenib in rats and humans. *Xenobiotica* 2019 Feb;49(2):200-10.
- (7) Quek L, David MD, Kennedy A, Metzner M, Amatangelo M, Shih A, et al. Clonal heterogeneity of acute myeloid leukemia treated with the IDH2 inhibitor enasidenib. *Nat Med* 2018 Aug;24(8):1167-77.
- (8) Intlekofer AM, Shih AH, Wang B, Nazir A, Rustenburg AS, Albanese SK, et al. Acquired resistance to IDH inhibition through trans or cis dimer-interface mutations. *Nature* 2018 Jul;559(7712):125-9.
- (9) Long B, Wang LX, Zheng FM, Lai SP, Xu DR, Hu Y, et al. Targeting GLI1 Suppresses Cell Growth and Enhances Chemosensitivity in CD34+ Enriched Acute Myeloid Leukemia Progenitor Cells. *Cell Physiol Biochem* 2016;38(4):1288-302.
- (10) Costello RT, Mallet F, Gaugler B, Sainty D, Arnoulet C, Gastaut JA, et al. Human acute myeloid leukemia CD34+/CD38- progenitor cells have decreased sensitivity to chemotherapy and Fas-induced apoptosis, reduced immunogenicity, and impaired dendritic cell transformation capacities. *Cancer Res* 2000 Aug 15;60(16):4403-11.
- (11) Martinelli G, Oehler VG, Papayannidis C, Courtney R, Shaik MN, Zhang X, et al. Treatment with PF-04449913, an oral smoothed antagonist, in patients with myeloid malignancies: a phase 1 safety and pharmacokinetics study. *Lancet Haematol* 2015 Aug;2(8):e339-e346.
- (12) Cortes JE, Heidel FH, Hellmann A, Fiedler W, Smith BD, Robak T, et al. Randomized comparison of low dose cytarabine with or without glasdegib in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 2019 Feb;33(2):379-89.

- (13) Tremblay G, Westley T, Cappelleri JC, Arondekar B, Chan G, Bell TJ, et al. Overall survival of glasdegib in combination with low-dose cytarabine, azacitidine, and decitabine among adult patients with previously untreated AML: comparative effectiveness using simulated treatment comparisons. *Clinicoecon Outcomes Res* 2019;11:551-65.
- (14) Cortes JE, Douglas SB, Wang ES, Merchant A, Oehler VG, Arellano M, et al. Glasdegib in combination with cytarabine and daunorubicin in patients with AML or high-risk MDS: Phase 2 study results. *Am J Hematol* 2018 Nov;93(11):1301-10.
- (15) Sallman DA, Komrokji RS, Sweet KL, Mo Q, McGraw KL, Duong VH, et al. A phase 2 trial of the oral smoothed inhibitor glasdegib in refractory myelodysplastic syndromes (MDS). *Leuk Res* 2019 Jun;81:56-61.
- (16) Smith CC. The growing landscape of FLT3 inhibition in AML. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2019 Dec 6;2019(1):539-47.
- (17) Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N Engl J Med* 2017 Aug 3;377(5):454-64.
- (18) Lim Y, Gondek L, Li L, Wang Q, Ma H, Chang E, et al. Integration of Hedgehog and mutant FLT3 signaling in myeloid leukemia. *Sci Transl Med* 2015 Jun 10;7(291):291ra96.
- (19) Perl AE, Martinelli G, Cortes JE, Neubauer A, Berman E, Paolini S, et al. Gilteritinib or Chemotherapy for Relapsed or Refractory FLT3-Mutated AML. *N Engl J Med* 2019 Oct 31;381(18):1728-40.
- (20) Antar AI, Otrrock ZK, Jabbour E, Mohty M, Bazarbachi A. FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: ten frequently asked questions. *Leukemia* 2020 Mar;34(3):682-96.
- (21) Lauria F, Raspadori D, Rondelli D, Ventura MA, Fiacchini M, Visani G, et al. High bcl-2 expression in acute myeloid leukemia cells correlates with CD34 positivity and complete remission rate. *Leukemia* 1997 Dec;11(12):2075-8.
- (22) Konopleva M, Pollyea DA, Potluri J, Chyla B, Hogdal L, Busman T, et al. Efficacy and Biological Correlates of Response in a Phase II Study of Venetoclax Monotherapy in Patients with Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Discov* 2016 Oct;6(10):1106-17.
- (23) Chyla B, Daver N, Doyle K, McKeegan E, Huang X, Ruvolo V, et al. Genetic Biomarkers Of Sensitivity and Resistance to Venetoclax Monotherapy in Patients With Relapsed Acute Myeloid Leukemia. *Am J Hematol* 2018 May 17.
- (24) Wei AH, Montesinos P, Ivanov V, DiNardo CD, Novak J, Laribi K, et al. Venetoclax plus LDAC for patients with untreated AML ineligible for intensive chemotherapy: phase 3 randomized placebo-controlled trial. *Blood* 2020 Mar 27.
- (25) DiNardo CD, Pratz K, Pullarkat V, Jonas BA, Arellano M, Becker PS, et al. Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naive, elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2019 Jan 3;133(1):7-17.
- (26) Gutman JA, Pollyea DA. Hypomethylating agents with venetoclax: have we discovered the holy grail? *Curr Opin Hematol* 2020 Mar;27(2):76-80.

- (27) Jin S, Cojocari D, Purkal JJ, Popovic R, Talaty NN, Xiao Y, et al. 5-Azacitidine Induces NOXA to Prime AML Cells for Venetoclax-mediated Apoptosis. *Clin Cancer Res* 2020 Feb 13.
- (28) DiNardo CD, Tiong IS, Quaglieri A, MacRaild S, Loghavi S, Brown FC, et al. Molecular patterns of response and treatment failure after frontline venetoclax combinations in older patients with AML. *Blood* 2020 Mar 12;135(11):791-803.
- (29) Pei S, Pollyea DA, Gustafson A, Stevens BM, Minhajuddin M, Fu R, et al. Monocytic Subclones Confer Resistance to Venetoclax-Based Therapy in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discov* 2020 Apr;10(4):536-51.
- (30) Komarova NL, Burger JA, Wodarz D. Evolution of ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014 Sep 23;111(38):13906-11.
- (31) Stuart T, Satija R. Integrative single-cell analysis. *Nat Rev Genet* 2019 May;20(5):257-72.
- (32) McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol* 2018 Feb 21;120:5.
- (33) Han L, Qiu P, Zeng Z, Jorgensen JL, Mak DH, Burks JK, et al. Single-cell mass cytometry reveals intracellular survival/proliferative signaling in FLT3-ITD-mutated AML stem/progenitor cells. *Cytometry A* 2015 Apr;87(4):346-56.
- (34) Zeng Z, Konopleva M, Andreeff M. Single-Cell Mass Cytometry of Acute Myeloid Leukemia and Leukemia Stem/Progenitor Cells. *Methods Mol Biol* 2017;1633:75-86.
- (35) Stoeckius M, Zheng S, Houck-Loomis B, Hao S, Yeung BZ, Mauck WM, III, et al. Cell Hashing with barcoded antibodies enables multiplexing and doublet detection for single cell genomics. *Genome Biol* 2018 Dec 19;19(1):224.
- (36) Stoeckius M, Hafemeister C, Stephenson W, Houck-Loomis B, Chattopadhyay PK, Swerdlow H, et al. Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells. *Nat Methods* 2017 Sep;14(9):865-8.
- (37) Gupta SD, Sachs Z. Novel single-cell technologies in acute myeloid leukemia research. *Transl Res* 2017 Nov;189:123-35.
- (38) Povinelli BJ, Rodriguez-Meira A, Mead AJ. Single cell analysis of normal and leukemic hematopoiesis. *Mol Aspects Med* 2018 Feb;59:85-94.
- (39) Won EJ, Kim HR, Park RY, Choi SY, Shin JH, Suh SP, et al. Direct confirmation of quiescence of CD34+. *BMC Cancer* 2015 Apr 2;15:217.
- (40) Sachs K, Sarver AL, Noble-Orcutt KE, LaRue RS, Antony ML, Chang D, et al. Single-Cell Gene Expression Analyses Reveal Distinct Self-Renewing and Proliferating Subsets in the Leukemia Stem Cell Compartment in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Res* 2020 Feb 1;80(3):458-70.
- (41) Nazha A. The MDS genomics-prognosis symbiosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2018 Nov 30;2018(1):270-6.
- (42) Chen J, Kao YR, Sun D, Todorova TI, Reynolds D, Narayanagari SR, et al. Myelodysplastic syndrome progression to acute myeloid leukemia at the stem cell level. *Nat Med* 2019 Jan;25(1):103-10.

- (43) Levine JH, Simonds EF, Bendall SC, Davis KL, Amir e, Tadmor MD, et al. Data-Driven Phenotypic Dissection of AML Reveals Progenitor-like Cells that Correlate with Prognosis. *Cell* 2015 Jul 2;162(1):184-97.
- (44) McMahon CM, Ferng T, Canaani J, Wang ES, Morrissette JJD, Eastburn DJ, et al. Clonal Selection with RAS Pathway Activation Mediates Secondary Clinical Resistance to Selective FLT3 Inhibition in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discov* 2019 Aug;9(8):1050-63.
- (45) Smith CC, Paguirigan A, Jeschke GR, Lin KC, Massi E, Tarver T, et al. Heterogeneous resistance to quizartinib in acute myeloid leukemia revealed by single-cell analysis. *Blood* 2017 Jul 6;130(1):48-58.
- (46) Xu L, Durruthy-Durruthy R, Eastburn DJ, Pellegrino M, Shah O, Meyer E, et al. Clonal Evolution and Changes in Two AML Patients Detected with A Novel Single-Cell DNA Sequencing Platform. *Sci Rep* 2019 Jul 31;9(1):11119.
- (47) Pellegrino M, Sciambi A, Treusch S, Durruthy-Durruthy R, Gokhale K, Jacob J, et al. High-throughput single-cell DNA sequencing of acute myeloid leukemia tumors with droplet microfluidics. *Genome Res* 2018 Sep;28(9):1345-52.
- (48) Ediriwickrema A, Aleshin A, Reiter JG, Corces MR, Kohnke T, Stafford M, et al. Single-cell mutational profiling enhances the clinical evaluation of AML MRD. *Blood Adv* 2020 Mar 10;4(5):943-52.
- (49) Corces MR, Buenrostro JD, Wu B, Greenside PG, Chan SM, Koenig JL, et al. Lineage-specific and single-cell chromatin accessibility charts human hematopoiesis and leukemia evolution. *Nat Genet* 2016 Oct;48(10):1193-203.
- (50) Potter N, Miraki-Moud F, Ermini L, Titley I, Vijayaraghavan G, Papaemmanuil E, et al. Single cell analysis of clonal architecture in acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 2019 May;33(5):1113-23.
- (51) Van GP, Hovestadt V, Wadsworth li MH, Hughes TK, Griffin GK, Battaglia S, et al. Single-Cell RNA-Seq Reveals AML Hierarchies Relevant to Disease Progression and Immunity. *Cell* 2019 Mar 7;176(6):1265-81.
- (52) Petti AA, Williams SR, Miller CA, Fiddes IT, Srivatsan SN, Chen DY, et al. A general approach for detecting expressed mutations in AML cells using single cell RNA-sequencing. *Nat Commun* 2019 Aug 14;10(1):3660.
- (53) Niemoller C, Renz N, Bleul S, Blagitko-Dorfs N, Greil C, Yoshida K, et al. Single cell genotyping of exome sequencing-identified mutations to characterize the clonal composition and evolution of inv(16) AML in a CBL mutated clonal hematopoiesis. *Leuk Res* 2016 Aug;47:41-6.
- (54) Paguirigan AL, Smith J, Meshinchi S, Carroll M, Maley C, Radich JP. Single-cell genotyping demonstrates complex clonal diversity in acute myeloid leukemia. *Sci Transl Med* 2015 Apr 1;7(281):281re2.
- (55) Taylor J, Mi X, North K, Binder M, Penson A, Lasho T, et al. Single-cell genomics reveals the genetic and molecular bases for escape from mutational epistasis in myeloid neoplasms. *Blood* 2020 Sep 24;136(13):1477-86.

- (56) Zhang J, Gu Y, Chen B. Mechanisms of drug resistance in acute myeloid leukemia. *Onco Targets Ther* 2019;12:1937-45.
- (57) Farawela HM, Khorshied MM, Kassem NM, Kassem HA, Zawam HM. The clinical relevance and prognostic significance of adenosine triphosphate ATP-binding cassette (ABCB5) and multidrug resistance (MDR1) genes expression in acute leukemia: an Egyptian study. *J Cancer Res Clin Oncol* 2014 Aug;140(8):1323-30.
- (58) Norgaard JM, Bukh A, Langkjer ST, Clausen N, Palshof T, Hokland P. MDR1 gene expression and drug resistance of AML cells. *Br J Haematol* 1998 Mar;100(3):534-40.
- (59) Park SH, Park CJ, Kim DY, Lee BR, Kim YJ, Cho YU, et al. MRP1 and P-glycoprotein expression assays would be useful in the additional detection of treatment non-responders in CML patients without ABL1 mutation. *Leuk Res* 2015 Oct;39(10):1109-16.
- (60) Robey RW, Pluchino KM, Hall MD, Fojo AT, Bates SE, Gottesman MM. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nat Rev Cancer* 2018 Jul;18(7):452-64.
- (61) Nasr AS, Sami RM, Ibrahim NY, Darwish DO. Glutathione S transferase (GSTP 1, GSTM 1, and GSTT 1) gene polymorphisms in Egyptian patients with acute myeloid leukemia. *Indian J Cancer* 2015 Oct;52(4):490-5.
- (62) Bose P, Gandhi V, Konopleva M. Pathways and mechanisms of venetoclax resistance. *Leuk Lymphoma* 2017 Sep;58(9):1-17.
- (63) Huang CH, Liao YJ, Chiou TJ, Huang HT, Lin YH, Twu YC. TGF-beta regulated leukemia cell susceptibility against NK targeting through the down-regulation of the CD48 expression. *Immunobiology* 2019 Sep;224(5):649-58.
- (64) Batlle E, Massague J. Transforming Growth Factor-beta Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity* 2019 Apr 16;50(4):924-40.
- (65) Teague RM, Kline J. Immune evasion in acute myeloid leukemia: current concepts and future directions. *J Immunother Cancer* 2013 Aug 27;1(13).
- (66) van Luijn MM, Chamuleau ME, Ossenkoppele GJ, van de Loosdrecht AA, Marieke van HS. Tumor immune escape in acute myeloid leukemia: Class II-associated invariant chain peptide expression as result of deficient antigen presentation. *Oncoimmunology* 2012 Mar 1;1(2):211-3.
- (67) Paczulla AM, Rothfelder K, Raffel S, Konantz M, Steinbacher J, Wang H, et al. Absence of NKG2D ligands defines leukaemia stem cells and mediates their immune evasion. *Nature* 2019 Aug;572(7768):254-9.

Figure 1 :

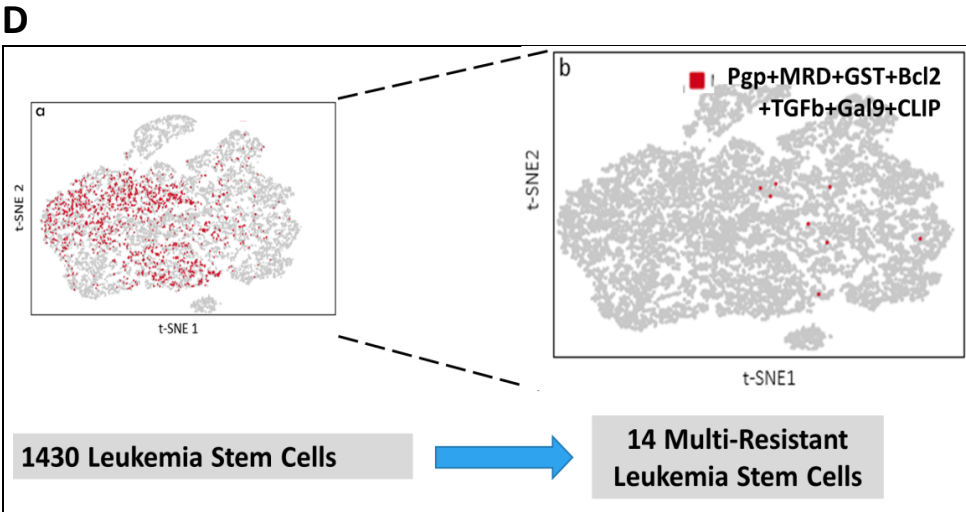
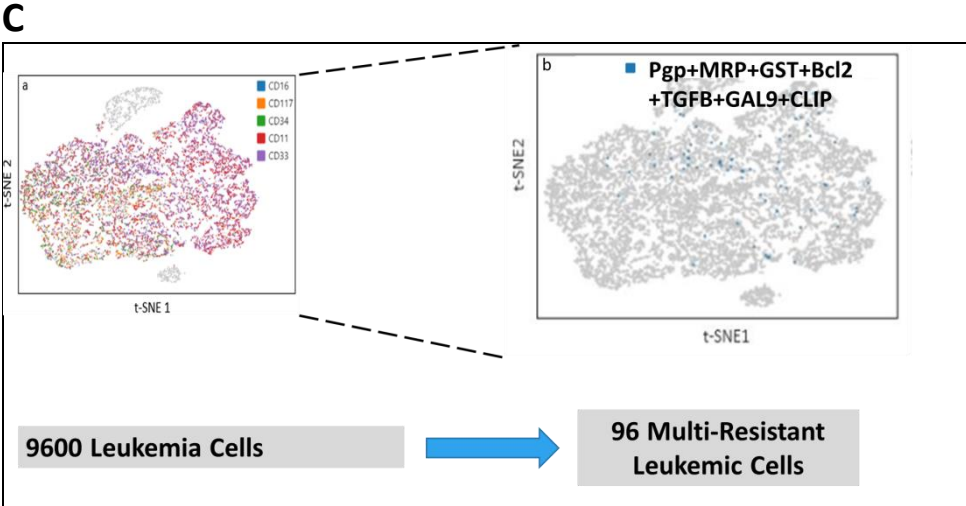
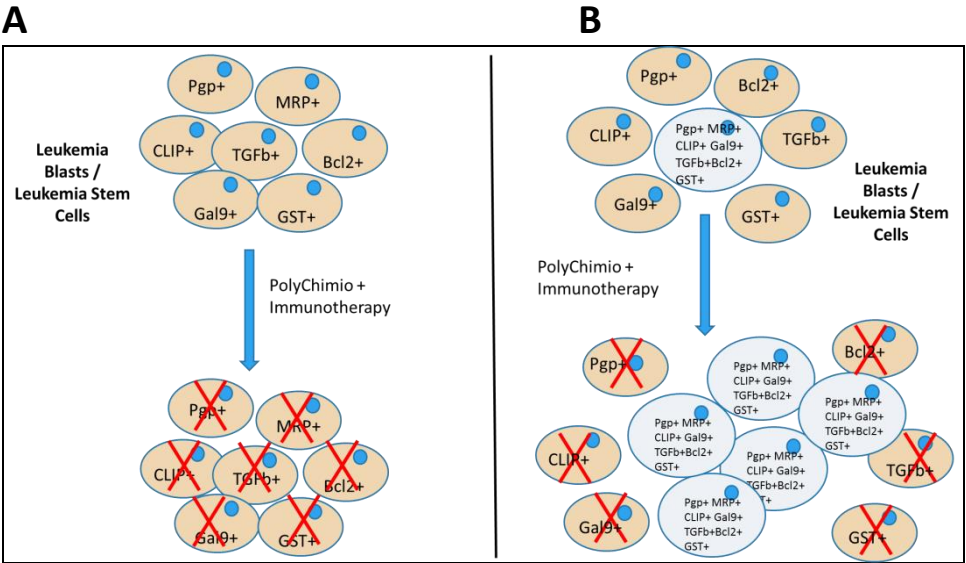
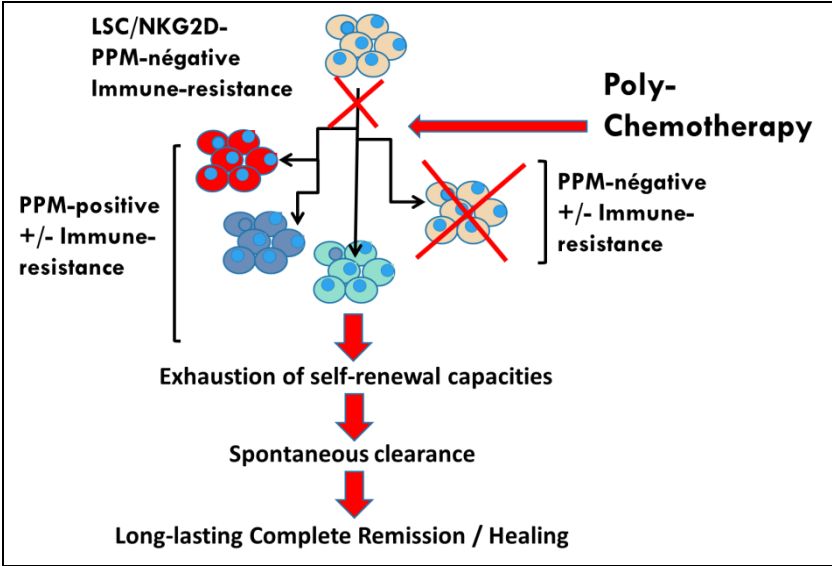


Figure 2 :

A



B

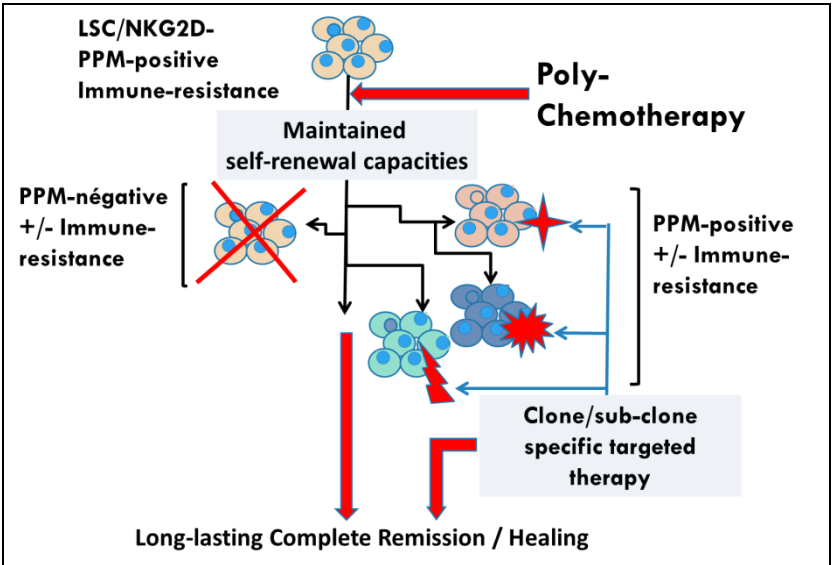


Fig. 3

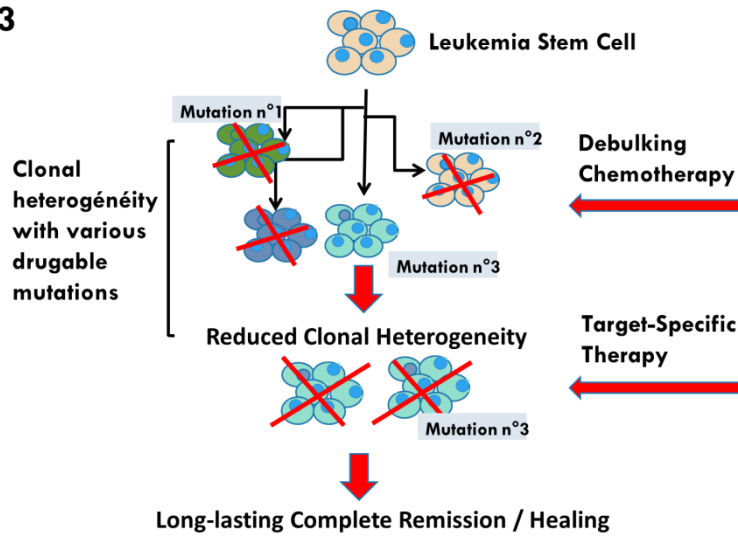
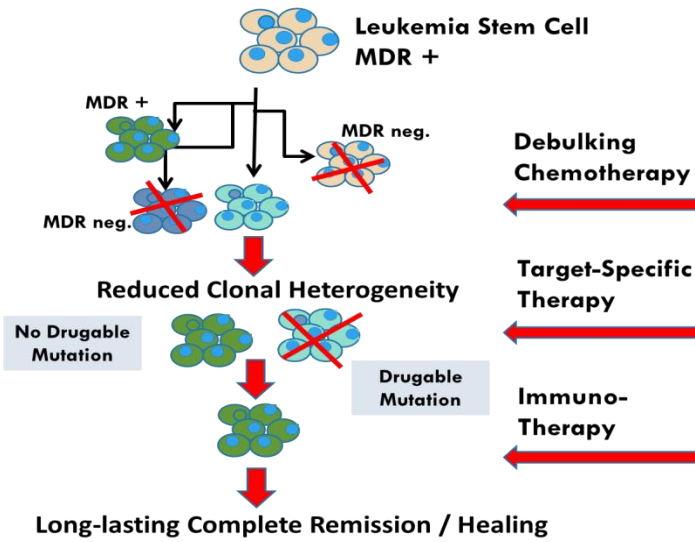


Fig. 4



ARTICLE 2:

DIMATE, un inhibiteur antinéoplasique de l'ALDH1/3, épargne les fonctions essentielles des effecteurs immunitaires.

Les chimiothérapies, en particulier celles utilisées dans les hémopathies malignes, sont souvent efficaces du point de vue anti-tumoral mais induisent un état d'immunosuppression nuisible 1) qui favorise, outre la neutropénie, de graves complications infectieuses, 2) qui peut nuire à l'immunothérapie (anticorps monoclonaux, IMiD) qui nécessite des effecteurs immunitaires fonctionnels, 3) qui peut nuire à la clairance ou au contrôle de la maladie résiduelle minimale qui dépend également de la réponse immunitaire anti-tumorale. Dans une étude précédente, nous avons montré qu'un inhibiteur des aldéhydes déshydrogénases 1 et 3, DIMATE, avait la capacité de détruire les cellules souches de la leucémie sans affecter les progéniteurs hématopoïétiques normaux. Nous avons voulu évaluer les effets de ce médicament sur le système immunitaire, en utilisant des populations de cellules non triées afin de s'éloigner le moins possible des conditions physiologiques *in vivo*. Nous avons testé DIMATE sur 1) la prolifération des cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) et des lymphocytes T, 2) la sécrétion d'IL-2, 3) les propriétés cytotoxiques des cellules tueuses naturelles, 4) l'éclatement oxydatif des granulocytes. À la concentration de CI50 déterminée sur les blastes leucémiques (2.8 μM), DIMATE n'a pas ou pas significativement altéré les fonctions mentionnées ci-dessus. Ces données suggèrent que DIMATE peut être utilisé en oncologie sans altérer la réponse immunitaire anti-tumorale spontanée ou l'efficacité des protocoles d'immunothérapie.

DIMATE, an antineoplastic ALDH1/3 inhibitor, spares pivotal functions of immune effectors.

Colle J^{1,2,3,4}, Baier C^{1,4}, Labiad Y^{1,4}, Rihet P^{1,2}, Pérez-Alea M⁴, Martin G⁴, Ceylan I⁴,
Venton G^{1,2,3}, and Costello R^{1,2,3*}

1 INSERM, UMR1090 TAGC, Marseille, F_13288, France

2 Aix-Marseille Université, UMR1090 TAGC, Marseille, F_13288, France

3 Service d'hématologie, APHM, Hôpital de la Conception, Marseille, France

4 Advanced BioDesign, Parc Technologique de Lyon, Woodstock - Bâtiment Cèdre 1, Saint Priest, France.

* **For correspondance:** Pr R Costello, Service d'hématologie, APHM, Hôpital de la Conception, 147 bd Baille, 13005 Marseille, France. Mail : regis.costello@free.fr, tel (33) 494 384 151

Key-words ; Acute myeloid leukemia, Aldehyde dehydrogenase inhibitor, T-Lymphocytes, Natural Killer Cells, Oxydative Burst, Granulocytes.

Abstract

Chemotherapies, especially those used in malignant hemopathies, are often effective from an anti-tumor point of view but induce a harmful state of immunosuppression 1) that favors, in addition to neutropenia, severe infectious complications, 2) that may impair immunotherapy (monoclonal antibodies, IMiDs) which require functional immune effectors, 3) that may impair the clearance or control of the minimal residual disease that also depends on the anti-tumor immune response. We have in a previous study shown that an inhibitor of aldehydes dehydrogenases 1 and 3, DIMATE, had the ability to destroy leukemia stem cells without affecting normal hematopoietic progenitors. We wanted to assess the effects of this drug on the immune system, using unsorted cell populations in order to move as little as possible from the in vivo physiological conditions. We tested DIMATE for 1) the proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and T lymphocytes, 2) IL-2 secretion, 3) cytotoxic properties of natural killer cells, 4) the oxidative burst of granulocytes. At the IC₅₀ concentration determined on leukemic blasts (2.8 μ M) DIMATE did not or not significantly altered the functions mentioned above. These data suggest that DIMATE can be used in oncology without altering the spontaneous anti-tumor immune response or the effectiveness of immunotherapy protocols.

Introduction

The direct toxic effects of chemotherapy on cells are not the unique way to eradicate tumours since immunotherapy is now part of many therapeutic protocols. Combination of monoclonal antibodies with chemotherapy has demonstrated significant results but requires a functional host immune system since it marginally relies (apart for conjugated antibodies) on the direct effect of Mab but mainly on antibody-driven cell cytotoxicity (ADCC) (1) Moreover, we do not know if chemotherapy is really able to eradicate the “ultimate cancer stem cell” or if it is the immune system that is able to eradicate or at least inhibits cancer stem cells development when the measurable residual disease (MRD) level is obtained (2). Finally, most chemotherapy regimens (more particularly used for haematological malignancies) are heavily immunosuppressive and favour classical and opportunistic infection even years after treatment completion. (3)

Thus, the possibility to use a drug with little or no immunosuppressive effects (ideally sparing normal cells but not the tumoral ones) should be of major interest for our anticancer armamentarium in order 1) to favour response to Mab, 2) contribute to eradicate/contain MRD, 3) avoid short and long-term infectious complications. (4)

In a previous report, we have shown that DIMATE eradicated leukaemia stem cells with some safety on healthy stem cell (5). For a population enriched for leukemia stem cells (LSCs) based on the Cd34+CD38- phenotype, IC50 values of DIMATE was 2.8 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ and no toxicity on normal hematopoietic stem cells (NHSC) until 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, thus determining a useful clinical concentration range between 2.8 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ and 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. These first results were detailed *in vitro* for human normal progenitor's samples and *in vivo* in an acute myeloid leukaemia (AML) mice model. In line with the pivotal importance of maintaining a functional immune system during chemotherapy, and based on the differential effect of DIMATE regarding leukemic vs normal myeloid cells, we herein have investigated the effect of DIMATE on some pivotal cells of the immune system, ie T-lymphocytes (TLs), natural killer cells (NKs) and granulocytes. In order to approach physiological conditions, we decided to work on total PBMCs or whole blood to develop assays instead of purified immune cell populations.

Materials and methods

Studied cells and the methods used are summarized in **Table 1**.

Humans blood samples

Healthy adult's blood samples were provided by the Etablissement Français du Sang. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were collected from fresh apheresis and were isolated from blood by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation (Sigma-Aldrich/Merck, #10771). Fresh PBMCs were used for experimentations in order to avoid the effects of cryopreservation more particularly on granulocytes functions.

PBMCs viability

Healthy PBMCs were seeded in 96 wells plate (Greiner bio-on, #665090) at concentrations of 2.10^5 cells/well, in RPMI-1640 GlutaMAX (Gibco, #61870-10) supplemented with 20% heat inactivated foetal bovine serum (FBS) (Gibco, #10270-106) and 30U/ml Il-2 IS (Miltenyi Biotec, #130-097-748). Seven concentrations of DIMATE (Advanced BioDesign, Lyon, France) were tested from 1 to 20 μ M. PBMCs were incubated 48 hours with DIMATE in a 37°C, 5% CO₂ atmosphere. Cell viability was monitored by AlamarBlue Cell viability protocol, on a Tristar LB 941 Multimode Microplate Reader. The drug sensitivity was quantified by the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) for each donor sample and determined by non-linear regression analysis of log-dose/response curve.

T cells proliferation and activation

Fresh PBMCs were suspended in supplemented medium to a final concentration of 1.10^6 cells/ml. Dynabeads Human T-activator CD3/CD28 (Life technologies, #11131D) were used to activate T lymphocytes at a bead-T cells ratio of 1:1. PBMCs were plated at 1.10^6 cells/ml in 24 wells plates and were incubated with 2 μ l of Dynabeads with or without 10 μ M of DIMATE solution. PBMCs were incubated at 37°C and were counted every two days for 15 days. To evaluate Il-2 production by T lymphocytes, PBMCs were plated in 96 wells plate, in complete medium without Il-2. Three conditions were compared: PBMCs alone, PBMCs with Dynabeads alone or associated with DIMATE 10 μ M. PBMCs were incubated in a humidified CO₂ incubator at 37°C for 48 hours. An aliquot of the activated T cells supernatants was collected and cryopreserved at -80°C. Thawed supernatants were evaluated for Il-2 production by Human Il-2 uncoated ELISA according manufacturer's instructions (Invitrogen, # 88-7025). Absorbance corresponding to Il-2 secretion was read at 450nm on a Tristar LB 941 Multimode Microplate Reader. The amount of Il-2 was determined by comparison with a standard curve prepared from Il-2 standard supplied by the manufacturer.

Target cells

K562 (DSMZ, #ACC10), a human chronic myelogenous leukaemia cell line was used for NK cell lysis assay. Log phase culture of K562 was maintained in RPMI-1640 GlutaMAX supplemented with 10% FBS at $5 \cdot 10^5$ cells/ml. K562 were washed and re-suspended in RPMI without phenol red (Gibco, #11835-030) at a concentration of $1 \cdot 10^6$ cells/ml and labelled by adding $5 \mu\text{l}$ of 1mM 3,3'-Diocetadecyloxacarbocyanine perchlorate (DIOC) per ml of cells. K562 were incubated at 37°C in 5% CO_2 incubator for 10 min, washed two times in RPMI without phenol red and re-suspended to a final concentration of $1 \cdot 10^6$ cells/ml in RPMI without phenol red. In NK cell cytotoxicity assay, 10 000 K562 labelled with DIOC were added in each test ratio.

NK cell activity assay

Fresh healthy PBMCs were firstly cultured for six days in 6 wells plate at $2 \cdot 10^6$ cells/ml, in supplemented RPMI GlutaMAX medium. PBMCs were then pre-treated with $5 \mu\text{M}$ and $10 \mu\text{M}$ of DIMATE for 6h in 37°C incubator at a concentration of $2 \cdot 10^6$ cells/ml in supplemented medium, in 12 wells plate. After incubation PBMCs were washed and re-suspended in supplemented medium to a final concentration of $2 \cdot 10^6$ cells/ml. Effectors (NK cells) and 10 000 labelled target cells were plated in 96 wells plate to create seven effector-to-target (E:T) ratios from 10:1, 5:1, 2,5:1, 1:1, 0,5:1, 0,3:1, 0,2:1. PBMCs containing NK cells and K562-DIOC were co-cultured overnight in supplemented medium. After 18h, $3 \mu\text{l}$ of propidium iodide solution (PI) at 1mg/ml was added to each tube before acquisition by flow cytometry (LSRII, Becton Dickinson Bioscience). A total of 1000 DIOC labelled elements were acquired. Data were analysed with the Kaluza Analysis software v1.5a (Beckman Coulter). Controls consisted in PBMCs only, DIOC labelled K562 only to obtain spontaneous lysis and a tube containing effector cells with PI added with DIOC K562 at the same time as the analysis. Per cent lysis was calculated as $[\text{cells positive for both DIOC and PI} / \text{total DIOC labelled cells}] \times 100 - \text{spontaneous lysis}$.

Leukocyte oxidative burst

To investigate phagocytic response of neutrophils and monocytes to produce ROS, $100 \mu\text{l}$ of fresh blood samples were first non-treated or pre-treated with 5 or $10 \mu\text{M}$ of DIMATE solution for 5 hours in 37°C incubator. Without washing step, oxidative burst was directly detected with PHAGOBURST™ kit (Glycotope Biotechnology, version 05/12), according to manufacturer's instructions. Briefly, opsonized E. coli bacteria and the fluorogenic substrate dihydrorhodamine 123 (DHR) were added to blood samples. During oxidative burst, DHR is converted in rhodamine 123 which fluoresces (FITC) when excited by a 488nm laser. Mean fluorescence intensity determined leukocytes phagocytic abilities.

Statistical analysis

Values to evaluate criteria of cellular function were expressed in mean \pm standard error mean value (s.e.m). To determine difference between treated cells versus untreated cells, we used Bonferroni test. $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

Results

IC50 of DIMATE on healthy PBMCs

DIMATE's IC50 was determined in healthy PBMCs, with a concentration of $2 \cdot 10^5$ cells/well, ($2 \cdot 10^6$ cells/ml) which corresponds to a physiological cell concentration in blood. IC50 was calculated using the untreated (NT) signal after a proliferation of 48 hours, and was $16.65 \mu\text{M}$ ($n=11$) (Fig 1a). Proliferation was calculated using the NT signal at H0. Complete blockade of proliferation at 48H was reached using a DIMATE concentration of $21.35 \mu\text{M}$ ($n=7$) (Fig 1b). Of note, at the $2.8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ that corresponds to IC50 for LSC, more than 75% viability was observed with very little proliferation inhibition. These first findings indicate that DIMATE is not toxic on human PBMC at low doses.

Evaluation of DIMATE impact on T cell function

In untreated PBMCs ($n=8$), T cells proliferated after stimulation with anti-CD3/CD28 with a 5-fold increase after 15 days. After addition of DIMATE $10 \mu\text{M}$, T cells proliferation tended to be slowed down but reached the same fold increase after 15 days of culture (Fig 2a). In parallel, production of IL-2 after 48 hours of treatment tended to be weaker than untreated cells but results were not significant ($p > 0.05$, Fig 2b). The results suggest that DIMATE, at a concentration able to eradicate nearly 100% of LSC, does not significantly impact T-cell proliferation and IL-2 secretion.

The effect of DIMATE on healthy NK cells activity

Natural killer cells are known to be the first line defence against bacterial and viral infections but also in immune surveillance of malignant cells. Here we evaluated NK cell cytotoxicity activity in co-culture assay containing PBMCs with MHC class I negative DIOC- labelled K562 as target cells. Spontaneous lysis of DIOC labelled K562 was determined during log phase culture by K562 DIOC and PI positive cells. NK cell activity was significantly decreased ($p < 0.05$) with pre-treatment with DIMATE $10 \mu\text{M}$ compared with untreated PBMCs, especially at 1:1 and 0.5:1 ratio. In other conditions, only a trend to decreased NK cell cytotoxicity was observed not reaching a statistical significance (Fig. 3). Of note, the DIMATE $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ is higher than the IC50 for LSC ($2.8 \mu\text{mol.L}^{-1}$) and non-statistically significant inhibition of NK cell lysis, thus suggesting that this concentration should not inhibit the innate anti-tumour immune response.

Evaluation of DIMATE effect on granulocytes oxidative burst

Since neutrophils and monocytes are involved in host defences and pathogen clearance, and may participate to ADCC, we tested the effect of ALDH inhibitor on their reactive oxygen species (ROS) production abilities. We observed that production of ROS by granulocytes did not change with DIMATE treatment 5 or $10 \mu\text{M}$ compared to untreated control (fig 4, $p > 0.05$).

Discussion

Therapy for malignant hemopathies is increasingly based on the immune-chemotherapy combination. In addition, the concept of residual disease leads us to believe that its eradication by treatment is difficult to achieve, if not impossible, and that it is useful for the patient's immune system to take over to destroy or at least prevent the development of residual clones. Unfortunately chemotherapy for malignant hemopathies is often highly immunosuppressive.

From the observation that the ALDH inhibitor DIMATE spares normal hematopoietic progenitors when used in a supposed therapeutic dose, we hypothesized this drug might be less toxic to the effectors of the innate or acquired immunity. Inhibition of ALDH1 and 3 by DIMATE induces an increase in hydroxy-2-nonenal (HNE) and malondialdehyde (MDA) leading to an increase in hydrogen peroxide (H₂O₂) as well as the depletion of the level of GSH inducing a disturbance of the redox potential of the cell, the release of cytochrome C and the activation of caspases, leading to cell death by apoptosis (6). Cell survival or death depends on the balance between ROS and protective molecules. If the ROS and ALDH rates move in the same direction (high / high or low / low), the cell survives, but this is no longer the case if we are in a ROS_{high} / ALDH_{low} situation (7). The redox system plays a large role in the immune response (8). A low level of ROS is necessary for the survival of T lymphocytes. In this context, if the basic level of ROS is low, the effects of inhibition of ALDH1 and 3 by DIMATE will be weak, explaining the safety of this drug on T lymphocytes. Nevertheless, this data deserves to be criticized since T lymphocytes involved in an immune reaction are activated thus modify their redox equilibrium and could be exposed in vivo to DIMATE for an extended period which may allow the accumulation of ROS and thus toxic cellular derivatives. Furthermore, it should also be emphasized that the effect of ALDH inhibition could be different depending on the general conditions of the lymphocyte microenvironment, since in situations of oxidative stress the development of a Th1 type reaction is favored, against a Th2 type reaction in the opposite case, with therefore different DIMATE lymphocyte targets (Th1 vs Th2) (9). Regarding anti-tumor immunity (10), it should be noted that central memory T lymphocytes (T_{cm}) have a high potential for resistance to oxidative stress, allowing them to resist the tumor environment. In this context, it is difficult to predict the effects of the inhibition of ALDH, namely more toxic on the tumor cell than on its microenvironment. Regarding NK cells, they have a high level of resistance to oxidative stress, in particular by increasing the expression of thioredoxin-1 and peroxiredoxin during their activation, which would explain the absence of inhibition of their cytotoxicity by DIMATE (11). Finally, concerning granulocytes, they produce a cocktail of oxidative species during the so-called oxidative burst to attack tumor cells (12). In this case, the blocking of ALDH will certainly increase the intra-cellular oxidative status, but these cells are in essence effectively protected from ROS and evacuate oxidative reagents via neutrophils extracellular traps (NETs). (13)

These preliminary data suggest that DIMATE is probably less immunosuppressive than many chemotherapies, justifying its use in particular in combination with monoclonal antibodies.

However, a detailed study of the multiple and diverse populations of the immune system, as well as an immuno-monitoring of the first injections in humans will be necessary to confirm our hypotheses.

Reference List

1. Oncoimmunology, Antibody-dependent cell cytotoxicity in monoclonal antibody-mediated tumor immunotherapy. Pascale Hubert, and Sebastian Amigorena.
2. Dysregulated haematopoietic stem cell behaviour in myeloid leukaemogenesis Masayuki Yamashita, Paul V. Dellorusso, Oakley C. Olson, and Emmanuelle Passegué Nat Rev Cancer
3. Anticancer Agents Med Chem. 2013 Nov;13(9):1444-8. The complexity of aging: cancer risk among elderly people and infectious risk among those with cancer. Marilia Rita Pinzone¹, Massimiliano Berretta, Hans Wilhelm Doerr, Giuseppe Nunnari, Bruno Cacopardo
4. Targeting multiple signaling pathways: the new approach to acute myeloid leukemia therapy. Jenna L. CarterKatie Hege, Jay Yang, Hasini A. Kalpage, Yongwei Su, Holly Edwards, Maik Hüttemann, Jeffrey W. Taub and Yubin Ge
5. Aldehyde dehydrogenases inhibition eradicates leukemia stem cells while sparing normal progenitors. G Venton, M Pérez-Alea, C Baier, G Fournet, G Quash, Y Labiad, G Martin, F Sanderson, P Poullin, P Suchon, L Farnault, C Nguyen, C Brunet, I Ceylan, and R T Costello
6. Free Radic Res. 2008 Aug; 42(8): 689–706. doi: 10.1080/10715760802317663 Glutathione and apoptosis Magdalena L. Circu and Tak Yee Aw
7. Cancer Lett 2015 Dec 1;369(1):50-7. doi: 10.1016/j.canlet.2015.08.018.Epub 2015 Aug 28. Aldehyde dehydrogenases and cancer stem cells Xia Xu, Shoujie Chai, Pingli Wang, Chenchen Zhang, Yiming Yang, Ying Yang, Kai Wang
8. Kesarwani P, Murali AK, Al-Khami AA, Mehrotra S. Redox regulation of T-cell function: from molecular mechanisms to significance in human health and disease. Antioxid Redox Signal 2013 Apr 20;18(12):1497-534
9. Gostner JM, Becker K, Fuchs D, Sucher R. Redox regulation of the immune response. Redox Rep 2013;18(3):88-94

10. Kesarwani P, Thyagarajan K, Chatterjee S, Palanisamy V, Mehrotra S. Anti-oxidant capacity and anti-tumor T cell function: A direct correlation. *Oncoimmunology* 2015 Jan;4(1):e985942
11. *Free Radic Res.* 2010 May; 44(5). Reactive oxygen species in cancer Geou-Yarh Liou and Peter Storz.
12. Denning NL, Aziz M, Gurien SD, Wang P. DAMPs and NETs in Sepsis. *Front Immunol* 2019;10:2536
13. *Free Radic Biol Med* 2015 Dec;89:1024-35. Neutrophil NET formation is regulated from the inside by myeloperoxidase-processed reactive oxygen species Halla Björnsdottir , Amanda Welin , Erik Michaëlsson , Veronica Osla , Stefan Berg, Karin Christenson , Martina Sundqvist , Claes Dahlgren , Anna Karlsson , Johan Bylund

Tables and Figures

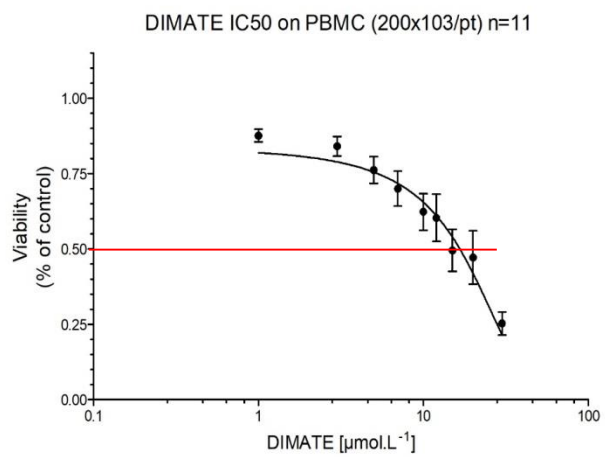
Table 1

Tested cells	Tissue	Stimulation	Incubation / DIMATE treatment	Method	Readout
PBMCs	PBMCs	30U/ml IL-2 SI	48h	fluorescence	Viability/ IC50
T cell function	PBMCs	30U/ml IL-2 SI + anti CD3/antiCD28	15 days 6h	Count/PI ELISA test	Proliferation IL-2 secretion
NK cells activity	PBMCs	30U/ml IL-2 SI	6h	Flow cytometry	DiO-K562 lysis
Neutrophils oxidative burst	Whole blood	Oposonized bacterias	5h	Flow cytometry	ROS production

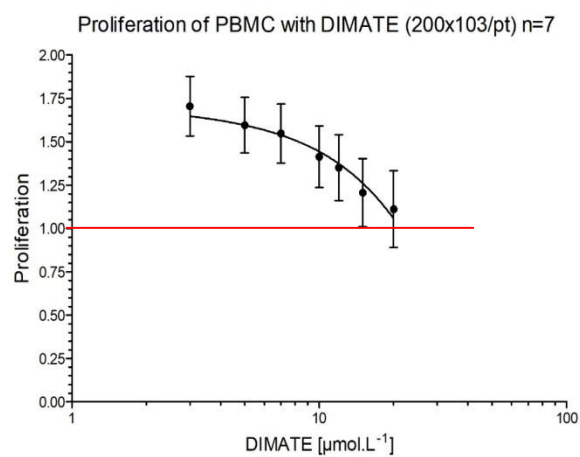
Summary of studied cells and the methods.

Figure 1

a



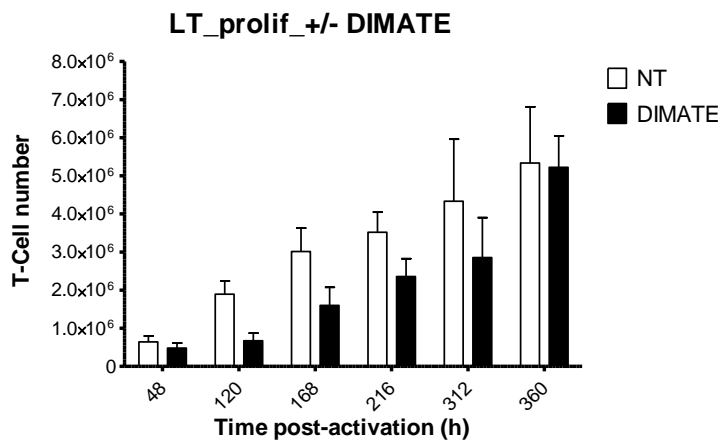
b



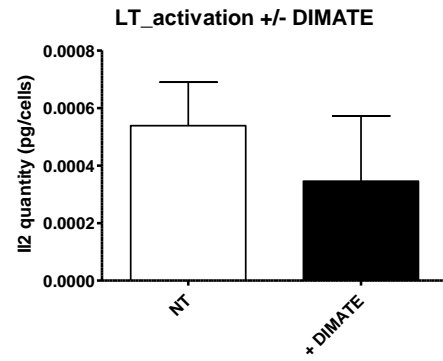
Dose-effect of DIMATE on PBMCs viability (Panel a) and proliferation (Panel b).

Figure 2

a

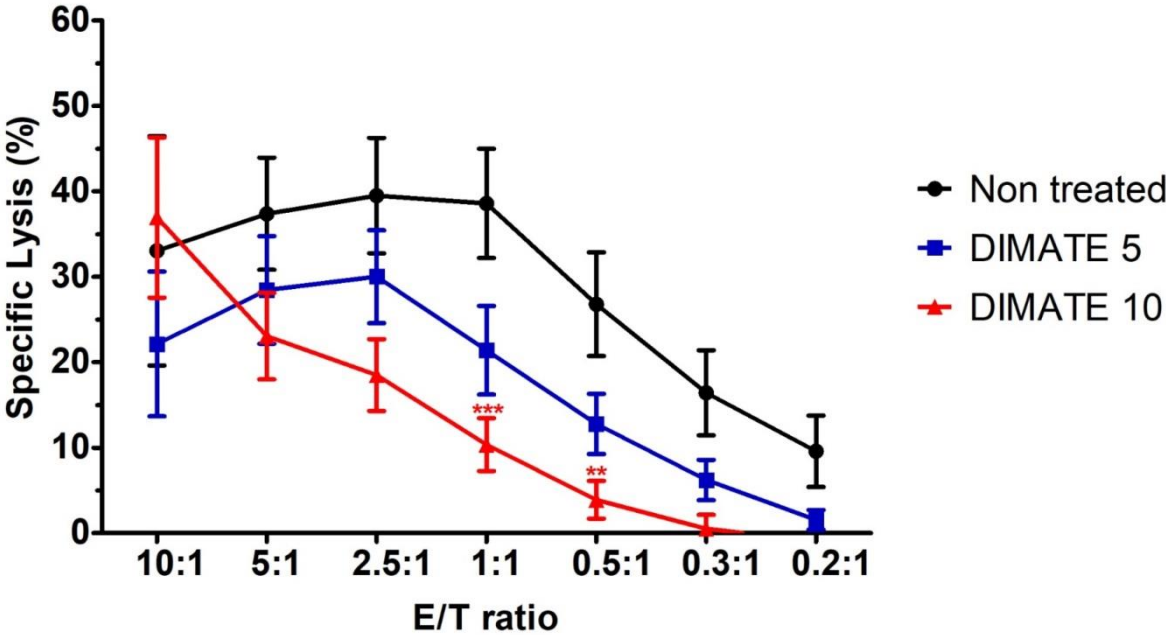


b



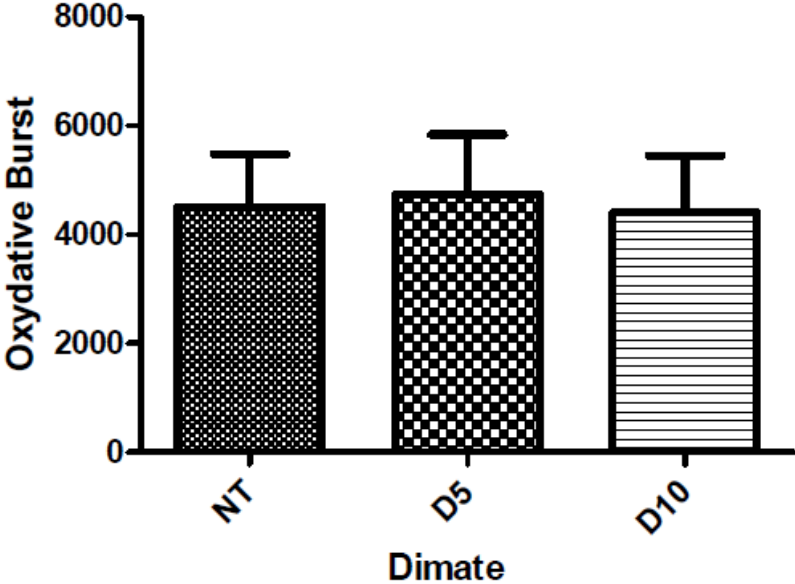
Dose-effect of DIMATE on T-lymphocytes proliferation (Panel a) and IL-2 secretion (Panel b).

Figure 3



Dose-effect of DIMATE on Natural Killer cell lysis.

Figure 4



Dose-effect of DIMATE on granulocytes oxydative burst.

ARTICLE 3:

Espèces réactives de l'oxygène chez les patients atteints de leucémie myéloïde aiguë : du marqueur pronostique à la cible thérapeutique

Les cellules cancéreuses ont un profil redox différent des cellules saines en raison de leur métabolisme spécifique. Sous l'effet d'un stress oxydatif intrinsèque persistant, de nombreuses cellules cancéreuses s'adaptent à ce stress et développent une capacité antioxydante endogène accrue. L'abrogation de ce mécanisme d'adaptation par des agents "pro-oxydants" comme le DIMATE, un inhibiteur de l'ALDH, pourrait constituer une stratégie de modulation redox intéressante pour affecter préférentiellement les cellules cancéreuses, sans affecter les cellules normales, et pourrait avoir des implications thérapeutiques importantes.

Puisque nous avons démontré que DIMATE tue les blastes de la leucémie et, plus intéressant encore, les cellules souches de la leucémie sans affecter les progéniteurs hématopoïétiques normaux, nous avons voulu soutenir davantage l'utilisation de DIMATE dans la leucémie en déterminant 1) le profil redox de la LMA au moment du diagnostic et son évolution en cas de rechute, 2) la corrélation de ce profil avec la classification pronostique de l'ELN, 3) la corrélation entre le profil redox et la survie, afin d'évaluer si le profil redox de la LMA pourrait être utilisé comme un test d'accompagnement qui pourrait aider à la décision de la stratégie thérapeutique, plus précisément pour l'utilisation potentielle de DIMATE. À cette fin, nous avons analysé prospectivement une cohorte de 97 patients atteints de LMA avec plus de 156 échantillons.

Nous avons identifié des marqueurs redox non seulement comme biomarqueurs pronostiques de la LMA, mais nous avons également mis en évidence leur valeur prédictive concernant la sensibilité des cellules de la LMA à DIMATE : un profil redox ROS élevé était associé à une maladie plus avancée, une diminution de la SG mais aussi à une plus grande efficacité de DIMATE. De plus, nous avons démontré que l'un des médicaments essentiels utilisés dans le traitement de la LMA, à savoir la cytarabine, induisait une augmentation des niveaux d'ALDH et de ROS, ce qui suggère que ce médicament devrait sensibiliser la LMA à DIMATE.

L'étude de cette cohorte prospective, associée à nos précédents travaux in vitro et sur des modèles murins, soutient fortement l'utilisation de DIMATE dans la LMA, et fournit une justification solide pour l'essai clinique de phase I prévu à court terme chez l'homme.

Reactive Oxygen Species in Acute Myeloid Leukemia patients: from the prognosis marker to the therapeutic target

Colle J^{1,2,3}, Venton G¹, Baier C², Labiad Y^{2,3}, Loosvelt M⁴, Tichadou A⁴, Perez M², Martin G², Arnoux I⁴, Farnault L¹, Ivanov V¹, Mercier C¹, Ceylan I², N'guyen C³, Costello R^{1,3}.

1 Clinical hematology departement, Conception, Assistance publique des Hôpitaux de Marseille, France

2 Advance Biodesign, Lyon, France

3 INSERM Labotaory, U 1090, Aix Marseille Université, France

4 Hematology Laboratory, Assistance publique des Hôpitaux de Marseille, France

Abstract

Cancer cells have a different redox profile from healthy cells due to their specific metabolism. Under persistent intrinsic oxidative stress, many cancer cells become well-adapted to such stress and develop an enhanced, endogenous antioxidant capacity. Abrogation of this adaptation mechanism with 'pro-oxidant' agents like DIMATE, an ALDH inhibitor, could be an attractive redox-modulating strategy to preferentially affect cancer cells, without affecting normal cells, and could have significant therapeutic implications.

Since we have demonstrated that DIMATE kills leukemia blasts, and more interestingly leukemia stem cells without affecting normal haematopoietic progenitors, we wanted to further support the use of DIMATE in primary acute myeloid leukemia taking into account the prognostic value of redox profil by integrating clinical and biological characteristics, in cohort of AML patient for which we have prospectively collected blood and bone marrow samples. We have investigated susceptibility to DIMATE in vitro both in acute leukemic cells lines and in primary AML blasts.

We identified redox markers not only as prognostic biomarkers in AML but we also pointed their predictive value regarding the sensitivity of AML cells to DIMATE: a ROS^{high} redox profile was associated with refractory disease, decreased OS for adverse ELN prognosis. ALDH1 level followed the same trend. We found a negative association between DIMATE IC 50 and ALDH1 level on leukemic cell line. Moreover, we demonstrated that one of the pivotal drug used in AML treatment, ie cytarabine, induced an increase of both ALDH and ROS levels, thus suggesting that this drug should sensitize AML to DIMATE.

The study of this prospective cohort, confirmed our previous findings in vitro and in mouse models and strongly support the use of DIMATE in AML, for further phase I study.

Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) is the most common acute leukemia in adults, with a median age of 69 years. Most patients with AML achieve complete remission (CR) after standard induction chemotherapy¹. However, many patients subsequently relapse and die of the disease which often has become refractory to chemotherapy. Despite progresses in targeted molecular therapies, the prognosis remains poor. Leukemic cells develop rapid resistance to these different treatments due to tumor heterogeneity (Madaci L, Colle J et al., submitted), insensitivity of leukemic stem cells^{2,3} to conventional therapies and adaptation of the different molecular pathways to selection pressure.

The aldehydes dehydrogenases (ALDHs) enzymes family, in human leukemic cells, mediates resistance to several drugs⁴ and high levels of ALDH activity predict for a poor outcome to treatment⁵. ALDHs gene family contains at least 19 isoforms that metabolize retinoids, reactive oxygen species (ROS) and endogenous and exogenous aldehydes⁶. ROS have many functions in biological systems, such as the peroxidation of unsaturated lipids⁷, leading to the intracellular accumulation of highly apoptogenic aldehydes. Among these different apoptogenic aldehydes two are particularly relevant: the aldehyde malondialdehyde (MDA), which is a chromatin crosslinking agent⁸, and the 4-hydroxynonenal (HNE), which induces directly cellular apoptosis⁹. HNE affects the cellular redox status¹⁰ by depleting glutathione (GSH), and then GSH depletion induces a mitochondrial crisis with mitochondrial ROS production¹¹ and activation of caspases-mediated apoptosis pathway¹². The different isoforms of ALDHs (ALDH1, 2 and 3) control the levels of MDA and HNE¹³. Therefore, through the modulation of intracellular HNE concentration, ALDHs control this GSH-based antioxidant redox system (GRS) and the cellular redox status¹⁴.

Cancer cells protect themselves from the apoptogenic effect of these aldehydes by the ALDHs that oxidize them to their non-apoptogenic carboxylic acids¹⁵. DIMATE is an active enzyme-dependent, competitive and irreversible inhibitor of ALDHs 1 and 3. *In vitro* and *in vivo*, DIMATE has cytotoxic activity on both leukemic stem cells and mature blasts while sparing healthy hematopoietic stem cells¹⁶. Cytotoxic effect of DIMATE is due to the inhibition of ALDH activity that leads to accumulation of apoptogenic aldehydes and ROS. ROS can induce different types of cancer cells death: apoptosis¹⁷, necroptosis¹⁸ and a non-apoptotic, iron-dependent oxidative death: ferroptosis¹⁹. Cancer cells are more dependent of these antioxidant mechanisms for their cellular survival and consequently more vulnerable to compounds that suppress key antioxidant systems in cells. Inducing preferential death on cancer cells based on a differential redox state in normal and malignant cells appears to be a new therapeutic approach. Many conventional chemotherapies lead to an increase of intracellular ROS level. However, cancer cells rapidly develop drug resistance through a redox adaptation of their metabolism²⁰.

Through this work, to eradicate leukemic cells and overcome drug resistance associated with redox adaptation, we analyze the complex redox alterations in primary AML blast cells while identifying DIMATE action mechanism. In a second step, we will focus on identifying new biomarkers in AML in relation to leukemic cells redox status. To this end, we will test DIMATE on a large prospective cohort of AML patients' samples. In the same time, *in vitro* short-term drug responsiveness will be studied through a redox blast profile analysis in order to develop companion drug response biomarkers.

Results

Population :

From September 2015 to April 2019, 97 patients were enrolled across Assistance publique des hôpitaux de Marseille, of whom we process 71 samples at diagnosis.

Clinical characteristic	Nb, (%)
Sample	156
Patient number	97
Age	
Median	68,6
Range	24-93
Sexe	
Male	59 (60,8)
Female	38 (39,2)
Disease	
AML	143 (91,7)
DMS	13 (8,3)
2017 ELN Classification (AML only)	
Favorable	30 (20,9)
Intermediate	53 (37,1)
Unfavorable	53 (37,1)
Undetermined	7(4,9)

Table 1 : Prospective cohort of AML patient

Sample characteristic	Nb, (%)
Sample	156
Nature of samples	
Peripheral blood	57 (36,5)
Bone marrow	99 (63,5)
2017 ELN Classification (AML only)	
Favorable	30 (20,9)
Intermediate	53 (37,1)
Unfavorable	53 (37,1)
Undetermined	7(4,9)
Treatment Lines (sample)	
Diagnosis	71 (45,5)
First line	59(37,8)
Second line	17(10,9)
Third line	9(5,8)

Table 2 : Sample characteristic

ROS and ALDH as prognosis biomarker in AML :

The AML samples were grouped into Good, Intermediate and Poor Risk cytogenetic categories and analyzed for levels of ALDH1A1 activity or ROS level in blood and bone marrow. It was the same according to the refractory character or not of the disease.

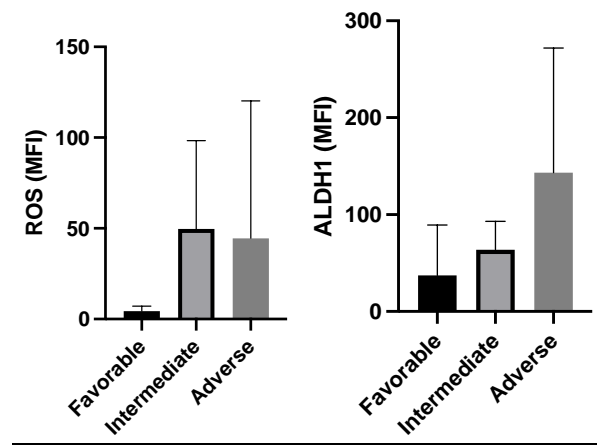
When comparing ROS and ALDH1 levels at T0 on blood and bone marrow according to ELN classification, in all cases there is an increase in parameters of the intermediate/adverse groups compared to the patients with favorable risk. (Figure 1 A, B).

The TCGA cohort includes 174 AML samples allowing, from public RNA seq data, confirmatory cohorts. ALDH1 RNA expression is strongly found in the intermediate and unfavorable ELN subgroups. Expression is significantly different in the favorable versus intermediate ($p < 0.0001$) and unfavorable ($p < 0.0001$) groups. (Figure 1 C)

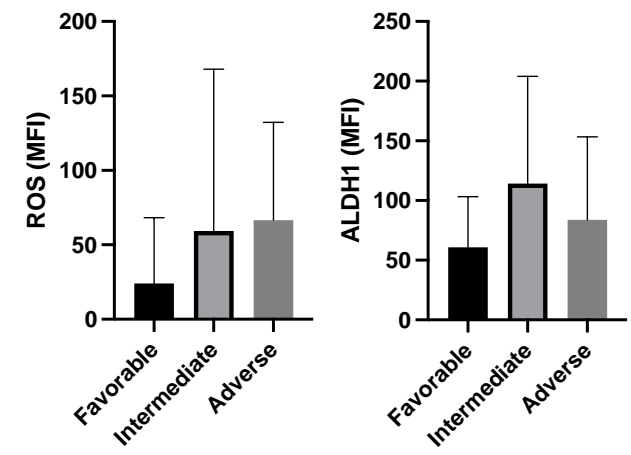
There is a trend toward increased ROS and ALDH1 in refractory patients compared with patients in complete remission. This trend is identical whether the sample is peripheral or of central origin. (Figure 2 A, B)

There is a correlation between ALDH1 and ROS at time 0 and time 2 in bone marrow. $r = 0.55$; $p = 0.016$ (pearson correlation). We observe an association at diagnosis between ROS high and ALDH1 high. ($p = 0.017$ according to Mann withney). (complementary data Figure 1) After completing chemotherapy, the detection of low levels of residual AML (termed measurable residual disease [MRD]) is highly predictive of subsequent relapse. Detecting low levels of MRD is challenging in AML, as it can be difficult to distinguish AML cells from healthy primitive hematopoietic cells. In addition, owing to clonal heterogeneity and genetic instability in leukemia, post-therapy AML cells are often phenotypically different from the original bulk AML population, which again renders their detection difficult. Despite these technical challenges, we assessed the ROS levels in the residual leukemic cells ($n = 6$ patients). ROS levels were increased in comparison with their level at diagnosis in the same patient (Mean MFI ROS at diagnosis 18,3, median 16,62; Mean ROS post treatment CR MRD pos 72,22; Median 65, 57) ($p < 0,05$). (Fig 2 C)

A)



B)



C)

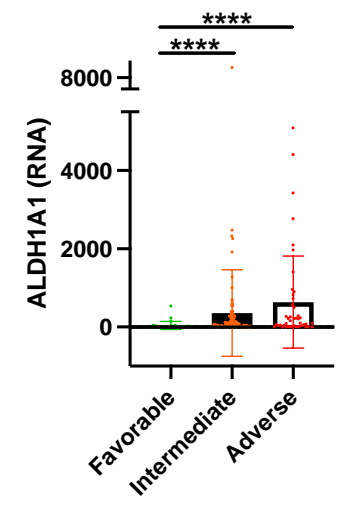
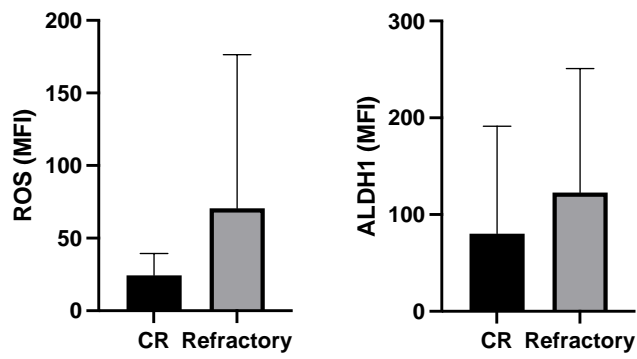
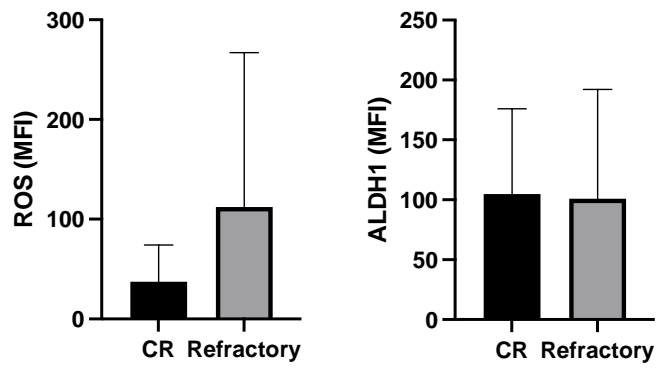


Figure 1 : ELN classification in AML primary blast and cell lines from TGCAA) ALDH1 and ROS according to ELN classification in blood; B) ALDH1 and ROS according to ELN classification in bone marrow; C) ALDH1 RNA level expression in TCGA cohort

A)



B)



C)

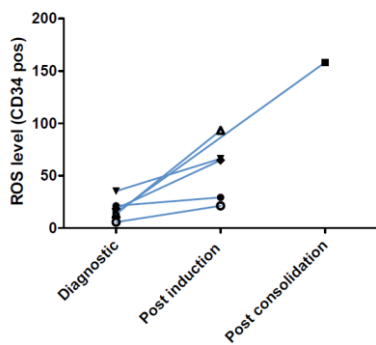


Figure 2: Redox profil in primary AML blast.

A) ALDH1A1 activity level and ROS refractory versus complete response in blood ; B) ALDH1A1 activity level and ROS refractory versus complete response in bone marrow; C) Evolution of ROS according to the MRD

Survival curve :

We next assessed the impact of ROS on OS of the 27 patients with *de novo* AML followed since initial diagnosis (table 3). Segregation of the two cohorts was done according to their level of ROS. Bifurcation of the AML cohort using this threshold ROS level (median ROS) demonstrated that patients with a high ROS level had significantly worse survival [HR = 5,6 (95% CI, 1,17-27,4), p = 0,003 ; (Fig 3 A.)

A)

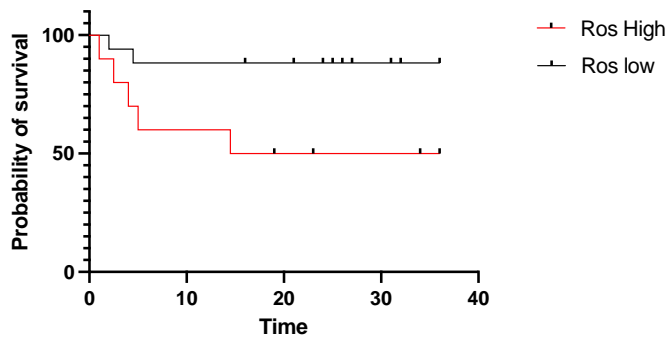


Figure 3 : A) Survival in the ROS high Versus ROS low population,

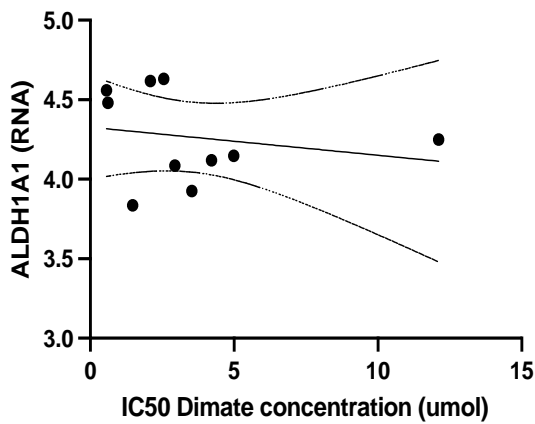
Charasteristic	ROS High (10)	ROS Low (17)	P Value
ELN Classification			
Favorable	1	6	0,2
Intermediate	4	6	0,9
Adverse	5	5	0,41
Sexe			
Men	4	9	0,69
Women	6	8	0,69

Table 3: Patients characteristic

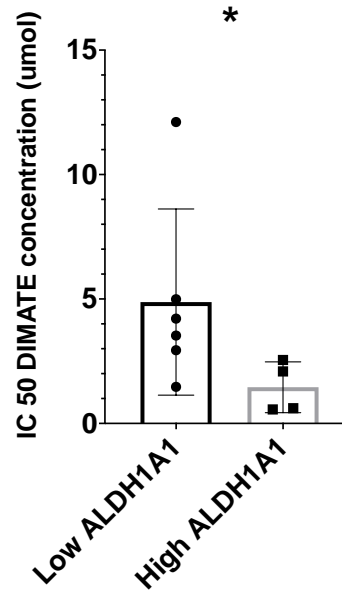
ROS predictive biomarker of DIMATE effectiveness:

We attempted to evaluate whether ROS or ALDH1 level could be used for revealing novel biomarkers for DIMATE sensitivity. For this purpose, we first determined the DIMATE sensitivity of 10 AML cell lines (figure 2 A,B). There is no correlation between ALDH1 RNA level expression and DIMATE IC 50 nevertheless extrem values of RNA ALDH1A1 were associated to better susceptibility to DIMATE (IC 50; $p=0,038$). We next evaluated DIMATE activity on primary blast from 13 AML patient of initial cohort. Neither ROS nor ALDH1 were correlated to IC50 Dimate.

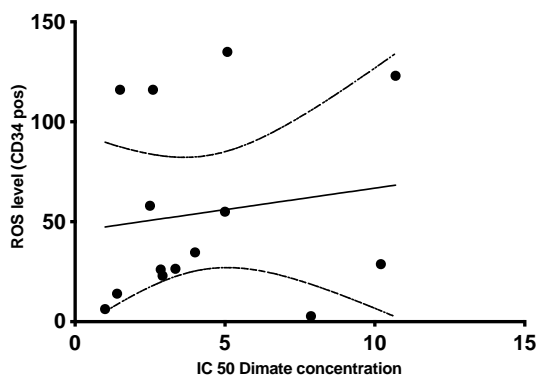
A) $r\ 0,27, p= 0,44$



B)



C) $r\ 0,26, p=0,62$



D) $r = -0,12 p =0,71$

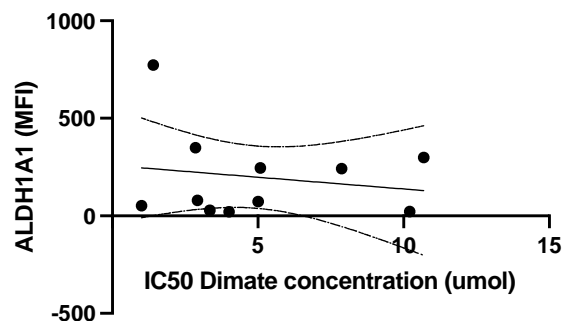


Figure 3: A) ALDH1 RNA from CCLE data base as a function of the DIMATE IC50, B) IC50 DIMATE as a function of ALDH1 RNA from CCLE data base C) Correlation between ROS phenotype level and IC 50 DIMATE, D) correlation ALDH1 and IC 50 DIMATE

Towards novel promising combine therapy : DIMATE and ARACYTINE

After preincubation to IC 25 Aracytine or IC 25 Daunorubicin we exposed 4 acute leukemia cell line to IC50 DIMATE. Both on DIMATE cell line resistant and on more susceptible (respectively THP1 and HL-60) we found that ARACYTINE highly sensitizes cell lines to DIMATE (THP1; $p < 0,01$ and HL60; $p < 0,001$).

We observe the same trend for DAUNORUBICIN. This finding highlighted the potential of combination with drugs routinely use in AML in first line treatment of newly diagnosed AML. (Figure 4).

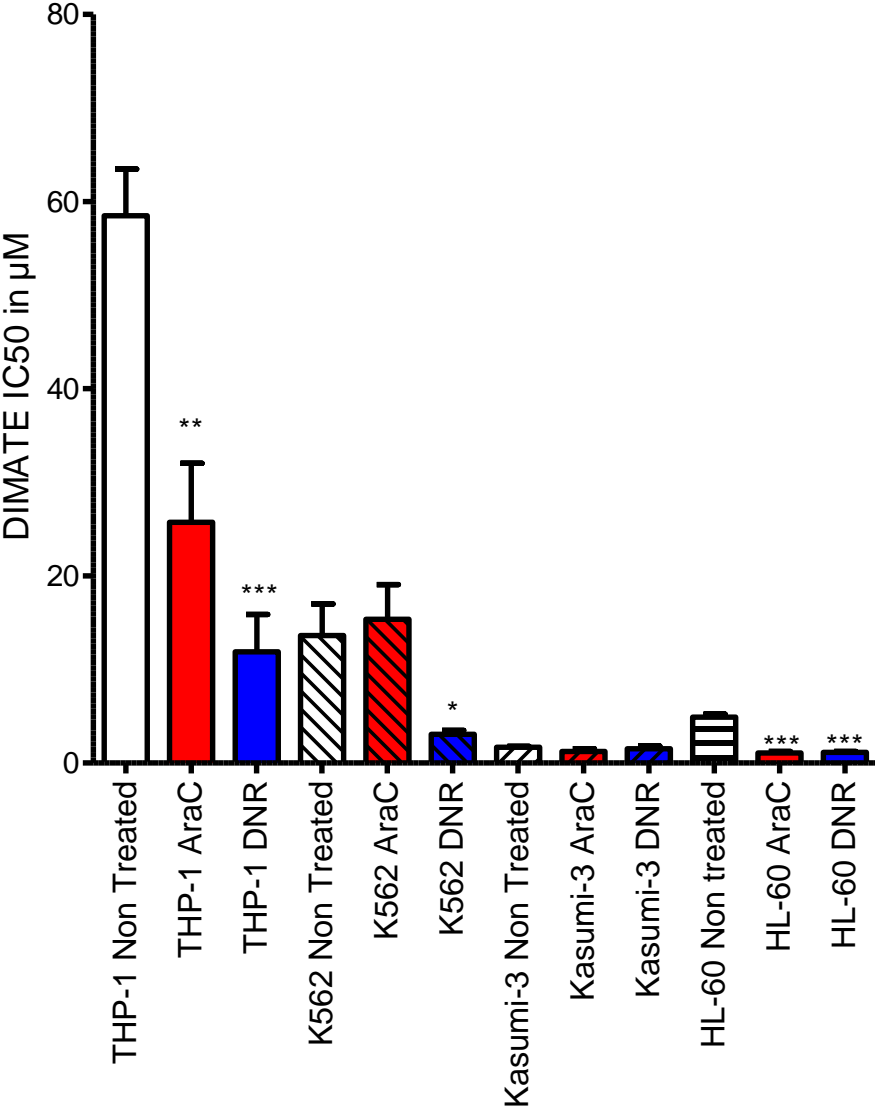


Figure 4 : Pre-incubation chemotherapy before DIMATE in cell lines AML

In order to investigate underlying mechanism of action in ARACYTINE sensitization of AML cell to DIMATE we have assed ROS level, ALDH activity and redox equilibrium and show that ARACYTINE increase significantly ROS level after 48h ARACYTINE exposure (Fig 5 A; H14 Vs H48 $p= 0,0027$). We observe the same trend but not significant for ALDH1 level and lipid peroxidation (respectively Fig 5 B and C).

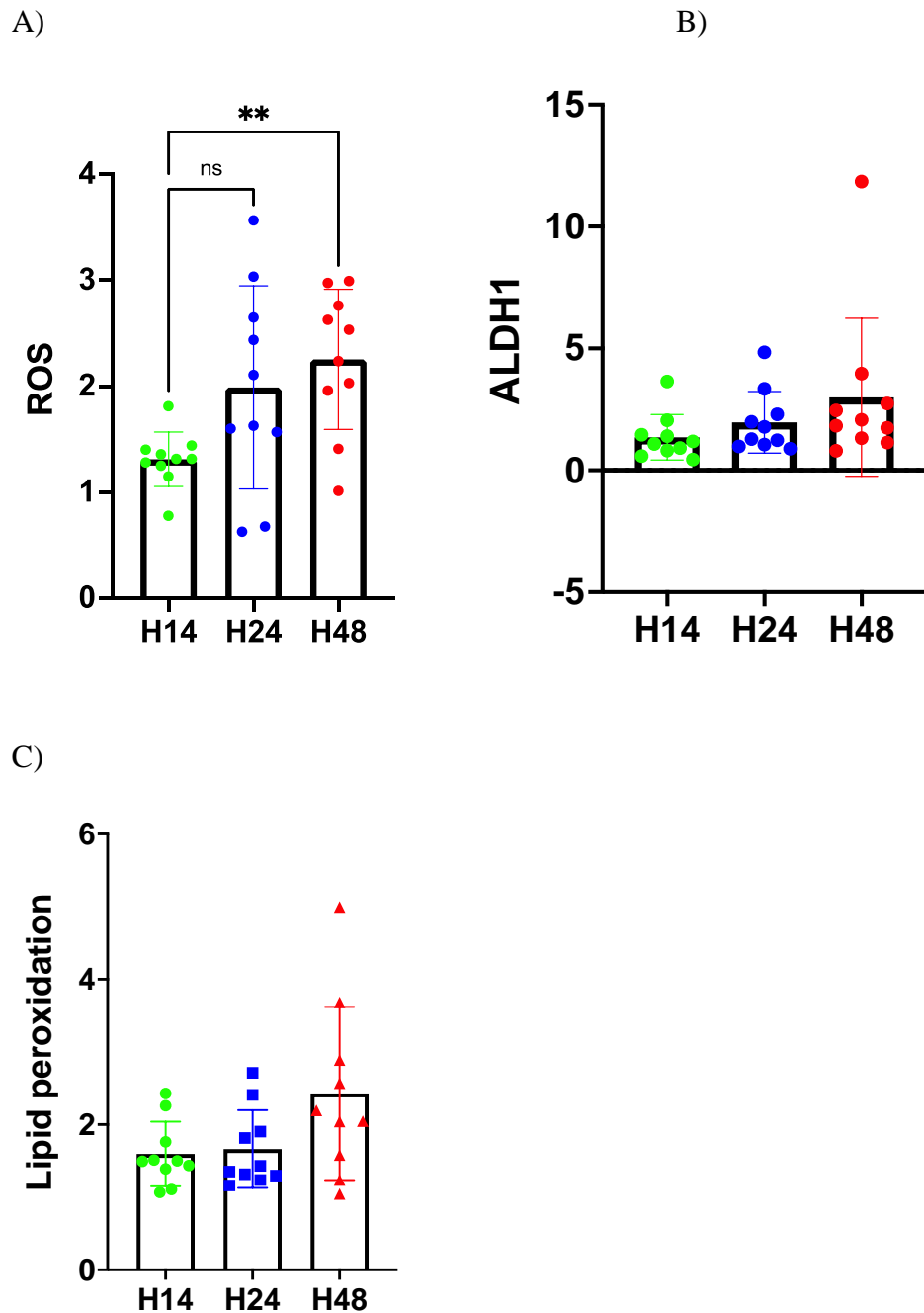


Figure 5: ROS, ALDH1 and lipid peroxidation incubated with cytarabine
A) ROS levels at 3 time points (14, 24 and 48h) in cell lines incubated with medium alone or cytarabine , B) ALDH activity levels at 3 time points (14, 24 and 48h) in cell lines incubated with medium alone or cytarabine, C) Lipid peroxidation at 14, 24 and 48h with cytarabine

Material and Methods :

Patient samples

Inclusion criteria included diagnosis of de novo or secondary AML or AML developing from myelodysplastic syndrome, except for French-American-British type M3. Patients had to have $\geq 20\%$ blasts in the blood or bone marrow. Peripheral blood and bone marrow samples from AML patients were collected after informed consent to diagnosis, in post induction, during follow-up or relapse. The ROS, ALDH and GSH assays were performed at the hematology laboratory of the Timone University Hospital. CR was defined by the presence of $<5\%$ blasts in the BM, with $>1 \times 10^9/L$ neutrophils and $>100 \times 10^9/L$ platelets in the PB with no detectable extramedullary disease.²⁷ Patients who met the above criteria but had neutrophil or platelet counts less than the stated values were considered to have achieved CRi (CR with incomplete recovery of PB counts). Prognosis stratification was evaluated according to ELN 2017 classification. (ELN 2017)

The Cancer Genome Atlas (TCGA) was used like cohort confirmation of data sample.

Cell lines

11 AML cell lines were grown in RPMI-1640 GlutaMAX (Gibco, #61870-10) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco, #10270-106). AML cell lines were plated at 5,105 cells/3ml in 6-well plates in a 37°C, 5% CO₂. 10 were analyse from cancer cell line encyclopedia.

AML cell lines were plated at 5,105 cells/3ml in 6-well plates in a 37°C, 5% CO₂ incubator. AML cell lines were untreated and treated with aracytin concentration leading to 60-80% total viability. ROS production, ALDH activity and lipid peroxidation were measured after 14, 24 and 48 hours of treatment

Isolation of CD34+ cells and culture ex vivo

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from leukemic cells patients were isolated by Ficoll-Hystopaque density gradient (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, France). CD34⁺ cell sorting was performed with the CD34 MicroBead Kit UltraPure (MACS ; Miltenyi Biotec, Paris, France). The purity of the preparation ($\geq 90\%$ of CD34⁺) was evaluated by flow cytometry. The CD34⁺-enriched cell sample was cultured in 96-well plate culture for 48 h at 6×10^6 cells/ml in CellGro medium (CellGenix GmbH, Freiburg, Germany) supplemented with the cytokines rh SCF (100ng/ml), rh TPO (20ng/ml) and rh Flt3 (50ng/ml).

Cellular viability

The CD34⁺ enriched cells were seeded in 96-well plates at a concentration of 50,000 cells/well. The cells were untreated or treated with seven concentrations of DIMATE

(Advanced BioDesign, Lyon, France), for 48 hours in a humid atmosphere at 37°C, 5% CO₂. Cell viability was monitored by AlamarBlue cellular viability (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) on TriStar LB 941 multimode microplate reader (Berthold Technologies, Thoiry, France). The maximum inhibitory half concentration (IC₅₀) is determined by a non-linear regression analysis of the cell line of the log-dose/response curve.

ALDEFLUOR assay

The activities of ALDH1 and ALDH3 were measured by the addition of substrates specific to both enzymes in the CD34⁺ enriched cell solution. Retinoate and benzoate were used to monitor ALDH1 and 3 respectively, they were used at the final concentration of 0.5μM. CD34⁺ are taken up in RPMI without phenol red (Gibco, #11835-030) medium at a concentration of 1.10⁶cells/ml and are incubated 30 minutes at 37°C with these substrates, coupled with fluorochrome (resorufine-650nm and fluorescein-530nm).

ROS detection

Cellular ROS production was measured using the ROS marker 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) (Merck, #D6883). The CD34⁺ enriched cells are taken up in RPMI without phenol red medium at a concentration of 1.10⁶cells/ml and incubated for 30 minutes at 37°C with DCFDA at a final concentration of 2μM. In the cell, DCFDA is de-esterified into a fluorescent signal read at 530nm in flow cytometry.

Statistical study

We used the prism software. The different comparisons were made according to the normal law when it applied or non-parametric tests when it was not the case. The ROC curve was used to calculate the area under the curve. Survival was calculated using the Kaplan Meyer method. The threshold of significance was <0.05. The correlation test performed is pearson or sperman.

Discussion

In prospective cohort we have showed there is a redox profile depending on the response to treatment. It is also associated with the presence of MRD. We have highlighted a deleterious prognostic impact of increased ROS levels in patients. The level of ALDH1 assessed phenotypically appears to be higher in patients with unfavorable ELN. These data are confirmed using transcriptomic expression of ALDH1. Preliminary combination data of DIMATE with ARACYTINE in cell lines improves the efficacy of DIMATE underpinned by a possible increase in ROS level by ARACYTINE.

First, high ROS and ALDH levels are both markers of bad prognosis in AML. As a consequence, we can hope that, in sharp contrast with standard chemotherapy, DIMATE could be more efficient in AML considered of bad prognosis in the ELN classification than in the good prognosis population. In the same way, ALDH activity and ROS level are higher in refractory patients that usually are hardly cured by chemotherapy. In patients with a positive MRD, there is an increase ROS level after diagnosis. The concomitant increase in ROS at MRD suggests that the level of ROS may be associated with the leukemic burden. Evaluating of other patients during phase 1 could conclude on the interest of monitoring ROS during the course of the disease to predict relapse with different response profiles.

Data from the literature show a negative prognostic impact of a high overall ALDH level when all isoforms are taken into account. Other articles focus on specific isoforms outside ALDH1A1 in AML. To our knowledge, an ALDH1A1 level has never been described as a predictive marker of response to induction²⁷.

No impact of ALDH1 level on overall survival was found. These different elements suggest that ALDH1 level is more associated with early response than with relapse. It would rather be a marker of intrinsic resistance to the disease.

ROS allow the reclassification of very unfavorable prognosis within the subgroup already of poor prognosis according to the international classification. Nevertheless, by taking into account both the ROS data and the ALDH expression, it is possible to show a correlation. Therefore, the small number of patients included in the survival analyses may have contributed to the failure to show a significant association of ALDH1 and survival. On TCGA the results are consistent with our data. The explanation concerning TCGA cohort could be related to different post-transcriptional modifications for ALDH1A1. In contrast to the other isoforms whose impact on survival has already been found²⁸.

Since cytarabine (and other cytotoxic drugs) modify the redox status of AML cell in favor of DIMATE efficiency, the doublet cytarabine/DIMATE is probably an interesting combination. Cytarabine in a manner consistent with the description in the literature, we find an increase in ROS in the treated lines. The same trend is found for ALDH1 and lipid peroxidation. This increase could explain the complementarity of cytarabine with DIMATE observed on some cell leukemic lines. In other models association of an ALDH inhibitor with another type of chemotherapy^{29,30} have already been assessed. In this last article taxol had a synergistic effect with an ALDH1 inhibitor.

Of note, in addition to the probable anti-tumor capacities of the DIMATE, our previous in vitro data demonstrated that, at the concentration able to kill more than 90% of leukemic cells and even leukemic stem cells, DIMATE did not show a significant toxicity on normal hematopoietic progenitors³¹. This suggests that DIMATE use should be devoid of the main

toxicity of most drug used in leukemia treatment, ie hematological toxicities. Because of its low toxicity, the addition of the ALDH inhibitor should not increase the risks associated with a chemotherapy treatment that already has significant side effects. This is especially true since the median age at diagnosis of AML is 67 years, with the co-morbidities inherent to an elderly person.

Because of the heterogeneity in the nature and status of the disease at the different time points of the samples, we decided to focus on the patients for whom we had samples at diagnosis. There may be also pre-analytical biases related to the storage and routing of samples evaluated for ROS.

Therefore, an effective redox-targeting therapeutic strategy will be able to promote redox stress to the point of cell death and suppress the cancer cell ability to adapt to redox stress³². Targeting the redox imbalance found in cancer cells has been shown to be feasible. Investigations on the therapeutic potential of the natural product, *b*-phenylethyl isothiocyanate (PEITC), exemplified an effective method of killing cancer cells via a redox-altering mechanism^{33,34}. Alternatively, inhibition of antioxidants the transcription factor Nrf2, increased the sensitivity of cancer cells to chemotherapeutic agents³⁵. Resistance to ROS-generating agents such as doxorubicin and cisplatin was found to be related to elevated levels of the antioxidant, GSH³⁶. Thus, use of the GSH depleting agent, buthionine sulfoximine (BSO), has been shown to enhance sensitivity of cancer cells to chemotherapeutic agents³⁷. In the nucleus, Nrf2 coordinately activates the transcription of a battery of cytoprotective proteins leading to reduced apoptosis, enhanced cell survival, and increased drug resistance. This is achieved through Nrf2 binding to antioxidant response element (ARE) present in the promoter regions of cytoprotective genes including glutathione S transferases³⁸. The overexpression of glutathione S transferases (GSTs), enzymes that catalyze the conjugation of reduced glutathione to electrophilic compounds, may reduce the reactivity of various anticancer drugs³⁹.

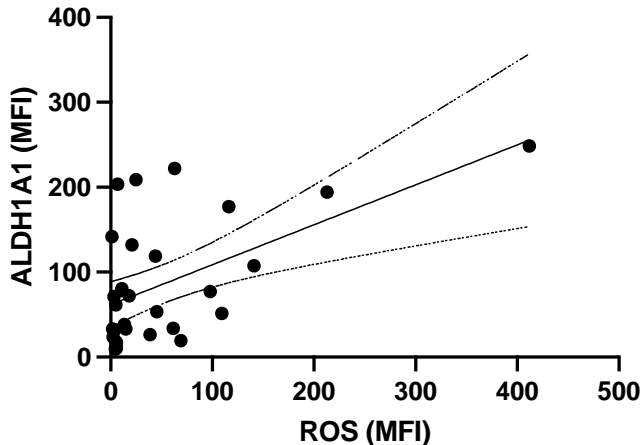
Redox regulation has been proposed to control various aspects of carcinogenesis, cancer cell growth, metabolism, migration, invasion, metastasis and cancer vascularization. Metabolic reprogramming of tumor cells through targeted inhibition is a new approach in 21st century medicine, with targeted therapies, molecular inhibitors and checkpoint inhibitors. In the context, DIMATE could be more effective when the patient with AML has a poor prognosis.

Conclusion

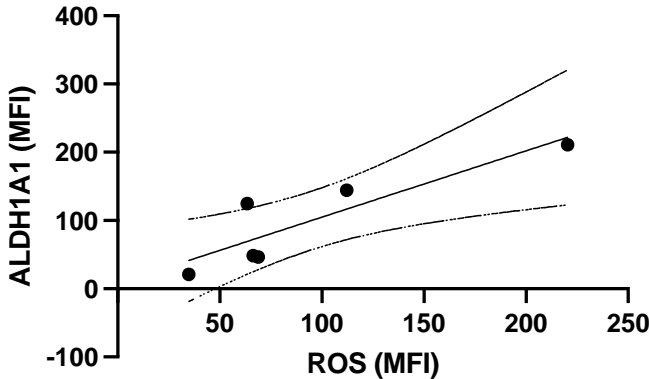
Our study provides a modern paradigm for preclinical drug development that improves the chances of correctly identifying drugs with redox activity to move forward into clinical trials. ALDH1 inhibition targets patients with a worse prognosis while limiting toxicity, particularly hematological toxicity. We confirm the interest of the possible combination of DIMATE with chemotherapy. Dimate could be administered with cytarabine, one of the most widely used drugs in AML. We have identified a drug targeting a poor prognostic anomaly that can be administered fairly early in the patient's course. Clinical trials evaluating novel anticancer therapies are expensive, time consuming, and expose patients to risk. We anticipate that adoption of this approach for preclinical evaluation and biomarker development will lead to improved patient selection and clinical trial outcomes.

Complementary data :

A)



B)



C)

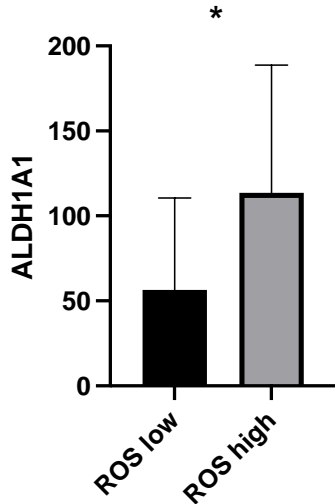


Figure 1 : A) and B) ALDH1 correlate to ROS in time 0 and 2. C) Association between ALDH1 and ROS

References

1. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010 ; 60 :277–300.
2. Jones RJ, Matsui WH, Smith BD. Cancer stem cells: are we missing the target? *J Natl Cancer Inst* 2004 ; 96 : 583–585
3. Huff CA, Matsui W, Smith BD, Jones RJ. The paradox of response and survival in cancer therapeutics. *Blood* 2006 ; 107 : 431–434
4. Koelling TM, Yeager AM, Hilton J, Haynie DT, Wiley JM. Development and characterization of a cyclophosphamide-resistant subline of acute myeloid leukemia in the Lewis x Brown Norway hybrid rat. *Blood*. 1990
5. Cheung AM, Wan TS, Leung JC, et al. Aldehyde dehydrogenase activity in leukemic blasts defines a subgroup of acute myeloid leukemia with adverse prognosis and superior NOD/SCID engrafting potential. *Leukemia*. 2007
6. Oxidative and reductive metabolism of lipid-peroxidation derived carbonyls, Mahavir Singh, Aniruddh Kapoor, and Aruni Bhatnagar
7. Esterbauer H, Eckl P, Ortner A. Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutat Res* 1990 ; 238 : 223–233.
8. Summerfield FW, Tappel AL. Cross-linking of DNA in liver and testes of rats fed 1,3-propanediol. *Chem Biol Interact* 1984 ; 50 : 87–96.
9. Townsend AJ, Leone-Kabler S, Haynes RL, Wu Y, Szveda L, Bunting KD. Selective protection by stably transfected human ALDH3A1 (but not human ALDH1A1) against toxicity of aliphatic aldehydes in V79 cells. *Chem Biol Interact* 2001 ; 130- 132 : 261–273.
10. Cell death and diseases related to oxidative stress:4-hydroxynonenal (HNE) in the balance
11. Raza H, John A. 4-hydroxynonenal induces mitochondrial oxidative stress, apoptosis and expression of glutathione S-transferase A4-4 and cytochrome P450 2E1 in PC12 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006
12. Liu W, Kato M, Akhand AA, Hayakawa A, Suzuki H, Miyata T, et al. 4-hydroxynonenal induces a cellular redox status-related activation of the caspase cascade for apoptotic cell death. *J Cell Sci*. 2000
13. Fournet G, Martin G, Quash G. α,β -Acetylenic amino thiolester inhibitors of aldehyde dehydrogenases 1&3: suppressors of apoptogenic aldehyde oxidation and activators of apoptosis. *Curr Med Chem* 2013 ; 20 : 527–533.
14. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*
15. Aldehyde dehydrogenases inhibition eradicates leukemia stem cells while sparing normal progenitors, G Venton, M Pérez-Alea, C Baier, G Fournet, G Quash, Y Labiad, G Martin, F Sanderson, P Poullin, P Suchon, L Farnault, C Nguyen, C Brunet, I Ceylan and RT Costello, *Blood cancer journal* 2016
16. Shin S, Buel GR, Wolgamott L, Plas DR, Asara JM, Blenis J, Yoon SO. ERK2 mediates metabolic stress response to regulate cell fate. *Mol Cell*. 2015
17. Shin S, Buel GR, Wolgamott L, Plas DR, Asara JM, Blenis J, Yoon SO. ERK2 mediates metabolic stress response to regulate cell fate. *Mol Cell*. 2015
18. Tang X, Wu J, Ding CK, Lu M, Keenan MM, Lin CC, Lin CA, Wang CC, George D, Hsu DS, Chi JT. Cystine deprivation triggers programmed necrosis in VHL-deficient renal cell carcinomas. *Cancer Res*. 2016
19. Ferroptosis: process and function Y Xie, W Hou¹, X Song, Y Yu, J Huang, X Sun, R Kang and D Tang, *cell death and differentiation*, 2016
20. Review Article | Published: 29 May 2009 Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach ? Dunyaporn Trachootham, Jerome Alexandre & Peng Huang, *Nature Reviews Drug Discovery* volume8, pages579–591 (2009)
21. Redox control of cancer cell destruction, *Redox Biol*. 2018 Jun; 16: 59–74.

22. Dixon, S.J. et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* **149**, 1060–1072 (2012)
23. Yagoda, N. et al. RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature* **447**, 864–868 (2007)
24. Yang, W.S. & Stockwell, B.R. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS harboring cancer cells. *Chem. Biol.* **15**, 234–245 (2008)
25. Gout, P.W., Buckley, A.R., Simms, C.R. & Bruchovsky, N. Sulfasalazine, a potent suppressor of lymphoma growth by inhibition of the xc⁻ cystine transporter: a new action for an old drug. *Leukemia* **15**, 1633–1640 (2001)
26. Murphy, T.H., Miyamoto, M., Sastre, A., Schnaar, R.L. & Coyle, J.T. Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron* **2**, 1547–1558 (1989)
27. High aldehyde dehydrogenase activity at diagnosis predicts relapse in patients with t(8;21) acute myeloid leukemia Lu Yang, Wen-Min Chen, Feng-Ting Dao, Yan-Huan Zhang, Ya-Zhe Wang, Yan Chang, Yan-Rong Liu, Qian Jiang, Xiao-Hui Zhang, Kai-Yan Liu, Xiao-Jun Huang, Ya-Zhen Qin *Cancer Med.* 2019 Sep; 8(12): 5459–5467. Published online 2019 Jul 3
28. Bone marrow stromal cells induce an ALDH⁺ stem cell-like phenotype and enhance therapy resistance in AML through a TGF- β -p38-ALDH2 pathway. Bin Yuan, Fouad El Dana, Stanley Ly, Yuanqing Yan, Vivian Ruvolo, Elizabeth J. Shpall, Marina Konopleva, Michael Andreeff, Venkata Lokesh Battula. *PLoS One.* 2020; 15(11): e0242809. Published online 2020 Nov 30.
29. Disulfiram/cytarabine eradicates a subset of acute myeloid leukemia stem cells with high aldehyde dehydrogenase expression Wanfang Yanga,b, Juan Xiea, Ruixia Houa, Xiuhua Chena, Zhifang Xua, Yanhong Tana, Fanggang Rena, Yaofang Zhanga, Jing Xua, Jianmei Changa, Hongwei Wang
30. Development of 2,5-dihydro-4H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-one inhibitors of aldehyde dehydrogenase 1A (ALDH1A) as potential adjuncts to ovarian cancer chemotherapy. Brandt C. Huddle, Edward Grimley, Mikhail Chtcherbinine, Cameron D. Buchman, Cyrus Takahashi, Bikash Debnath, Stacy C. McGonigal, Shuai Mao, Siwei Li, Jeremy Felton, Shu Pan, Bo Wen, Duxin Sun, Nouri Neamati, Ronald J. Buckanovich, Thomas D. Hurley, Scott D. Larsen
31. Aldehyde dehydrogenases inhibition eradicates leukemia stem cells while sparing normal progenitors. G Venton, M Pérez-Alea, C Baier, G Fournet, G Quash, Y Labiad, G Martin, F Sanderson, P Poullin, P Suchon, L Farnault, C Nguyen, C Brunet, I Ceylan, R T Costello. *Blood Cancer J.* 2016 Sep; 6(9): e469. Published online 2016 Sep 9.
32. Pelicano H, Carney D, and Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* 7 : 97– 110, 2004
33. Trachootham D, Zhou Y, Zhang H, Demizu Y, Chen Z, Pelicano H, Chiao PJ, Achanta G, Arlinghaus RB, Liu J, and Huang P. Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by betaphenylethyl isothiocyanate. *Cancer Cell* 10 : 241–252, 2006
34. Trachootham D, Zhang H, Zhang W, Feng L, Du M, Zhou Y, Chen Z, Pelicano H, Plunkett W, Wierda WG, Keating MJ, and Huang P. Effective elimination of fludarabine-resistant CLL cells by PEITC through a redox-mediated mechanism. *Blood* 112 : 1912–1922, 2008
35. Huang P, Feng L, Oldham EA, Keating MJ, and Plunkett W. Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature* 407 : 390–395, 2000.

36. Brozovic A, Majhen D, Roje V, Mikac N, Jakopec S, Fritz G, Osmak M, and Ambriovic-Ristov A. Alpha(v)beta(3) integrin-mediated drug resistance in human laryngeal carcinoma cells is caused by glutathione-dependent elimination of drug-induced reactive oxidative species. *Mol Pharmacol* 74 : 298–306, 2008.
37. Cabello CM, Bair WB 3rd, and Wondrak GT. Experimental therapeutics: targeting the redox Achilles heel of cancer. *Curr Opin Invest Drugs* 8 : 1022–1037, 2007.
38. T. H. Rushmore and C. B. Pickett, "Glutathione Stransferases, structure, regulation, and therapeutic implications," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 268
39. A. Sau, F. Pellizzari Tregno, F. Valentino, G. Federici, and A. M. Caccuri, "Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 500

