

**UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE PHARMACIE**

ANNEE 2004

67

**MEMOIRE
DU DIPLÔME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le Jury interrégional

le 3 novembre 2004

par M^{elle} Prié Nolwen

*Conformément aux dispositions de l'arrêté
du 10 septembre 1990 tient lieu de:*

**THESE
POUR LE DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Les voies PI3K et mTOR dans les leucémies aiguës myéloïdes: Rôles et mécanismes d'activation
--

**Président :
Membres du Jury :**

**M. le Professeur Jean Marie BARD
M. le Professeur Hervé AVET-LOISEAU
M. le Docteur Didier BOUSCARY
M. le Professeur Jean Luc HARROUSSEAU**

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	4
RESUME	6
AVANT-PROPOS	7
L'INTRODUCTION	8
I.1.Définition	8
I.2.Epidémiologie	8
I.3.Etiologie	8
I.4.Clinique	9
I.5.Diagnostic	10
I.5.1. Hémogramme	10
I.5.2. Myélogramme	11
I.5.3. Cytochimie	11
I.5.4. Immunophénotype	12
I.5.5. Cytogénétique	12
I.5.6. Bilan d'extension et des complications biologiques	12
I.6.Diagnostic différentiel	13
I.7.Classification	13
I.7.1. FAB	15
I.7.2. OMS	16
I.8.Facteurs pronostic	17
I.9. Evolution	17
I.10. Traitement	18
I.10.1. Traitement d'induction	18
I.10.2. Traitement de consolidation	19
I.10.3. Cas particuliers	19
I.10.4. Traitement par allogreffe de moelle osseuse	20
I.10.5. Traitement par autogreffe	20
I.10.6. Traitement adjuvant	21
I.10.7. Traitement des reprises évolutives	21
I.11. Mécanismes moléculaires de la genèse des leucémies aiguës myéloblastiques	22
I.12. Les voies PI3K/Akt et mTOR/P70S6K/4E-BP1	24

I.12.1. La voie PI3K/Akt	24
I.12.1.1. Effets anti-apoptotiques de la voie PI3K/Akt	25
I.12.1.2. Effets mitogéniques de la voie PI3K/Akt	26
I.12.1.3. Implications en oncogenèse	27
I.12.2. La voie mTOR/P70S6K/4E-BP1	28
I.12.2.1 Structure de la protéine mTOR	28
I.12.2.2. Localisation de la protéine mTOR	29
I.12.2.3. Conséquences de l'activation de mTOR : fonctions	29
I.12.2.4. Les inhibiteurs de la voie mTOR	30
I.13. But du travail	31
II.MATERIEL ET METHODES	34
II.1. Patients	34
II.2. Purification des blastes	34
II.3. Cyto-centrifugations	35
II.4. Biochimie	35
II.4.1. Anticorps utilisés	35
II.4.2. Préparation de lysats cellulaires	35
II.4.3. Immunoempreintes	36
II.5. Purification de cellules CD34+ de sang placentaire	37
II.6. Immunofluorescence	37
II.7. Cytométrie en flux	37
II.8. Tests fonctionnels	38
II.8.1. Test de prolifération par incorporation de thymidine tritiée	38
II.8.2. Etude de l'apoptose par fixation d'annexine V-PE	38
II.9. Test de clonogénicité en méthylcellulose	39
III.RESULTATS	40
III.1. Activation constitutive de la voie PI3K/Akt dans les cellules blastiques de LAM	40
III.2. La sous unité p110δ est la seule constamment exprimée dans les cellules blastiques	43
III.3. L'IC87114, inhibiteur spécifique de la p110δ, inhibe la prolifération des cellules blastiques PI3K+ mais n'a pas d'effet sur la survie	44
III.3.1. L'IC87114 inhibe complètement la phosphorylation d'Akt dans les blastes PI3K+	44
III.3.2. L'IC87114 inhibe la prolifération des cellules blastiques	47

III.3.3. L'IC87114 ne modifie pas la prolifération des progéniteurs CD34+ normaux	48
III.3.4. L'IC87114 n'a pas d'effet sur la survie des cellules blastiques PI3K+	49
III.4. La voie mTOR/P70S6K/4E-BP1	51
IV. DISCUSSION	55
CONCLUSION	59
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	60

ABBREVIATIONS

Akt/PKB	Protein kinase B
AMPK	AMP-activated protein kinase
ATRA	Acide tout – trans rétinoïque
BH2	Bcl 2 homology region
Bim	Bcl 2 interacting mediator of cell death
CD	Cluster of differentiation
Cdk	Cyclin dependent kinase
CSH	Cellule souche hématopoïétique
CSL	Cellule souche leucémique
eIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
4E-BP1	eIF4E-binding protein 1
FAB	French-American-British
FISH	Hybridation in situ en fluorescence
FLT3	Fms like tyrosine kinase 3
Fms	CSF-1 receptor
FOXO 3a/FKHRL1	Forkhead box transcription factor, group O
GAB	Grb2 associated binder
GSK3β	Glycogen synthase kinase - 3 β
Hif-1α	Hypoxia-inducible factor 1
IκB	Inhibitor of NF- κ B
IKK	I κ B kinase
IRS	Insulin Receptor Substrat
ITD	Internal Tandem Duplication
Kda	Kilodalton
LAL	Leucémies aiguë lymphoblastique
LAM	Leucémie aiguë myéloblastique
LMC	Leucémie myéloïde chronique
LMMC	Leucémie myélo-monocytaire chronique
MAPK	Mitogen activated protein kinases
MAPK +	Activation constitutive de la voie MAPK
MDS	Myélodysplasie
MDR	Multi drug resistance
MGG	May Grünwald Giemsa
MPO	Myéloperoxydase
mTOR	mammalian target of rapamycine
NF-κB	Nuclear factor κ B
NFS	Numération formule sanguine
NOD/SCID	Non obese diabetic/severe combined immunodeficiency
OMS	Organisation mondiale de la santé
PCR	Polymérase chain reaction
PDK-1	3-Phosphoinositide dependent kinase
PE	Phycoérythrine
PH	Pleckstrin homology
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase

PI3K +	Activation constitutive de la voie PI3K
PIKK	Phosphoinositide kinase kinase
PIP 2	Phosphoinositide bisphosphate (3-4 ou 4-5)
PIP 3	Phosphoinositide 3-4-5 trisphosphate
PTEN	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 1
P70S6K/S6K1	Ribosomal p70S6 kinase 1
RC	Rémission complète
Rheb	Ras-homolog enriched in brain
RTK	Récepteur à activité tyrosine kinase
SCF	Stem cell factor
Ser	sérine
SHIP 1	Src-homology 2(SH2) domain containing phosphatase
SKP	S- phase linase associated protein
SMD	Syndorme myélodysplasique
STAT	Signal transducer and activator of transcription
Thr	thréonine
TSC1	Hamartin
TSC2	Tuberin
Tyr / Y	tyrosine

RESUME

Les leucémies aiguës myéloblastiques (LAMs) sont des hémopathies malignes, dérivées de progéniteurs hématopoïétiques de la lignée myéloïde, bloqués à des stades variables de leur différenciation. Une activation constitutive de la voie PI3K/Akt a été démontrée dans environ 50 % des cas de LAMs. De plus l'utilisation d'un inhibiteur chimique de la PI3K, le LY294002, montre que cette activation constitutive confère aux cellules blastiques un avantage prolifératif et de survie.

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'activation des PI3K dans les LAMs, l'expression des différentes isoformes α , β , et δ des PI3K de classe Ia a été étudiée. Seule l'isoforme p110 δ de la PI3K est constamment exprimée dans les cellules leucémiques. Un inhibiteur spécifique de la p110 δ , l'IC87114, supprime complètement la phosphorylation d'Akt dans les cellules blastiques PI3K+, et inhibe leur prolifération sans induire leur apoptose. En revanche, il n'inhibe pas la prolifération des cellules leucémiques PI3K-, ni celle des cellules CD34+ de sang placentaire. Ces résultats démontrent l'importance de l'isoforme p110 δ dans le contrôle de la prolifération des blastes PI3K+.

Par ailleurs, une phosphorylation constitutive des protéines P70S6K et 4E-BP1, en aval de mTOR est retrouvée dans la plupart des cellules leucémiques démontrant une activation de cette voie. Cette activation s'exerce indépendamment de l'activité PI3K observée. En effet, la phosphorylation de ces deux protéines n'est pas inhibée par l'IC87114. De plus, l'association de l'IC87114 à la rapamycine, inhibiteur de mTOR, potentialise l'effet inhibiteur des deux drogues sur la prolifération des cellules PI3K+. Le mécanisme d'activation de mTOR, indépendant d'Akt, reste à déterminer.

Ainsi, une dérégulation de l'activité traductionnelle en aval de mTOR pourrait être impliqué dans la biologie des LAMs.

Cependant, ni la voie PI3K/Akt, ni la voie mTOR ne contrôle la survie des cellules leucémiques. Il paraît donc indispensable de restaurer une voie d'apoptose dans ces cellules blastiques pour envisager l'utilisation en clinique de thérapeutiques ciblées, comme l'IC87114 ou la rapamycine.

Avant-propos

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) constituent une entité distincte au sein des leucémies aiguës. Elles ont pour origine la transformation d'une cellule souche ou d'un progéniteur hématopoïétique myéloïde.

Dans cette pathologie où le traitement repose essentiellement sur la chimiothérapie et où la fréquence élevée des rechutes ne permet d'obtenir que 20 à 30% de guérison chez l'adulte, les études s'orientent aujourd'hui, vers de nouvelles cibles thérapeutiques. Les résultats récemment obtenus avec l'imatinib (Glivec*) dans la leucémie myéloïde chronique (Druker et al., 2001) et plus récemment dans d'autres syndromes myéloprolifératifs, comme certains syndromes d'hyperéosinophilie avec délétion en 4q12 [FIP1L1/PDGFR α] ou certaines leucémies myélo-monocytaires chroniques (LMMC) avec t(5 ; 12) [Tel/PDGFR β], sont encourageants. L'inhibition de l'activité kinase constitutive de FLT3 dans les LAM avec duplication en tandem juxtamembranaire de FLT3 par des inhibiteurs tels que le PKC412 ou le CEP701, laisse augurer d'une nouvelle classe de drogues actives dans les LAM. En aval de ces récepteurs, l'inhibition spécifique de voies de signalisation impliquées dans divers aspects biologiques des LAM est donc une voie de recherche d'avenir.

Une activation constitutive des voies STAT3/5, ERK/MAPK et NF-kB a déjà été décrite dans les LAM. Nous nous sommes intéressés, dans cette étude, aux voies PI3K/Akt et mTOR, toutes deux impliquées dans la transduction de signaux de survie et de prolifération au cours de l'hématopoïèse (Bouscary et al., 2003; Cantley, 2002). Une dérégulation de ces voies de signalisation a été décrite dans de nombreux cancers (Vivanco and Sawyers, 2002). Après avoir montré une activation constitutive de la voie PI3K/Akt dans la moitié des LAM, nous avons étudié les effets d'un inhibiteur spécifique de l'isoforme p110 δ de la PI3K, sur la signalisation, la prolifération et l'apoptose des cellules blastiques. Cette sous-unité semble, en effet, jouer un rôle majeur dans les processus de signalisation et de survie des cellules leucémiques. Nous avons poursuivi ce travail par l'étude de la voie mTOR, décrite en aval d'Akt dans de nombreux modèles.

Ainsi, la recherche des dysrégulations de voies de signalisation pourrait permettre de mieux cibler la thérapeutique, en identifiant des groupes de patients répondeurs.

I.Introduction

I.1. Définition

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) constituent un groupe hétérogène d'hémopathies malignes caractérisées par:

- une expansion clonale, au niveau de la moelle osseuse, de cellules immatures (blastés), dérivant de la transformation maligne d'une cellule souche hématopoïétique ou d'un progéniteur myéloïde ayant acquis des capacités d'autorenouvellement. Ces cellules blastiques sont bloquées à des stades variables de leur différenciation et prolifèrent (Passegue et al., 2003). Des anomalies chromosomiques dont certaines sont spécifiques de certains types morphologiques de LAM sont identifiées.
- un défaut de production d'éléments hématopoïétiques matures dans le sang (insuffisance médullaire quantitative et qualitative).

I.2. Epidémiologie

Les LAM sont des affections rares, atteignant tous les âges et également les deux sexes. Elles représentent 70% de l'ensemble des leucémies aiguës et leur fréquence augmente avec l'âge.

I.3. Etiologie

Il s'agit

- soit de leucémies *de novo* ou primitives
- soit de leucémies secondaires
 - o évolution des syndromes myéloprolifératifs (tous mais surtout LMC) ou des syndromes myélodysplasiques
 - o les chimiothérapies : alkylants , inhibiteurs de topoisomérases II (VP16, anthracyclines...)
 - o environnement : benzène, pesticide, tabac

- o maladies constitutionnelles : Syndrome de Down (trisomie 21), maladie de Kostmann.

I.4. Clinique

La symptomatologie clinique est très polymorphe, parfois très riche, parfois très réduite.

Le diagnostic peut être évoqué lors:

- 1- de signes d'insuffisance médullaire, traduisant le retentissement de la prolifération tumorale sur les lignées myéloïdes normales:
 - a. Asthénie et pâleur dues à l'anémie
 - b. Purpura et hémorragies dus à la thrombopénie ou à la CIVD
 - c. Fièvre en rapport avec la neutropénie
- 2- Le syndrome tumoral, traduisant l'infiltration leucémique des organes hématopoïétiques et, éventuellement, d'autres organes:
 - a. Hépatomégalie, splénomégalie
 - b. Tumeurs cutanées ou osseuses, s'accompagnant parfois de douleurs
 - c. Plus rarement tumeur testiculaire ou méningite avec atteinte des nerfs crâniens
- 3- Parfois la maladie est révélée par une complication qui justifie un traitement spécifique en urgence
 - a. Une CIVD constamment observée dans les LAM3 ou promyélocytaire, mais aussi dans d'autres leucémies aiguës quand elles sont hyperleucocytaires ou tumorales
 - b. Un syndrome de lyse qui se caractérise par :
 - une hyperuricémie avec risque rénal
 - une hyperkaliémie avec risque cardiaque
 - une hyperphosphorémie avec risque rénal et cardiaque
 - une CIVD, plus rarement une acidose métabolique.

I.5. Diagnostic

Le diagnostic positif d'une LAM est un diagnostic biologique et repose sur la confrontation de la morphologie et de la cytochimie du sang et de la moelle osseuse ; de l'immunophénotype. La recherche d'anomalies chromosomiques clonales récurrentes, ayant une valeur pronostique, repose sur la cytogénétique classique : sur l'analyse en FISH (réarrangement MLL) et sur l'amplification par PCR des translocations récurrentes (AML1/ETO, PML/RAR α , CBF β /MYH11).

I.5.1. L'hémogramme :

C'est sur la base d'une numération formule sanguine (NFS), avec un examen du frottis sanguin coloré au May-Grunwald-Giemsa, que le diagnostic est évoqué. Cet examen montre généralement une cytopénie accompagnée d'une blastose anormale.

- Une anémie fréquente (70%), normocytaire ou légèrement macrocytaire, non régénérative.
- Une thrombopénie fréquente plus ou moins profonde, et une morphologie des plaquettes souvent anormale.
- Une leucocytose :
 - très variable: augmentée (50%), rarement très élevée, normale (15%), ou présence d'une leucopénie (35%).
 - Associant, qualitativement (formule leucocytaire) :
 - o Une neutropénie fréquente (80%)
 - o Des blastes, cellules hématopoïétiques immatures, dont le pourcentage variable est corrélé à la leucocytose
 - o Présence d'un hiatus de maturation (pas d'élément intermédiaire entre les polynucléaires et les blastes)
 - o Plus rarement, une monocytose (LAM4/5)
 - o Parfois : une myélémie discrète, des érythroblastes circulants
 - o Des anomalies morphologiques

Le myélogramme est indispensable dans tous les cas et doit être pratiqué avant tout traitement.

I.5.2. Le myélogramme:

- Typiquement riche, voire très riche
- Envahi par des blastes > 20%, par définition de l'OMS 97, monomorphes, hyperbasophiles, à noyaux plus ou moins régulier aux nucléoles souvent multiples, à chromatine fine.
- Déficit variable des autres lignées ou à l'inverse, expansion de l'une d'entre elles, dans les formes M4 à M7.
- Dans certaines formes présence d'éosinophiles et de basophiles.

En cas de fibrose médullaire (notamment dans les LAM7), l'aspiration est difficile et impose une biopsie médullaire, confirmant le diagnostic. Seul le myélogramme précisera le type cytologique exact de la leucémie aigue, et permet de réaliser un prélèvement pour l'étude cytogénétique et moléculaire.

- La nature myéloïde de la LA peut être établie formellement, par simple morphologie si :
 - Les blastes présentent des corps d'Auer, des granulations de Chediak ou des granulations azurophiles multiples.
 - Il existe des signes de myélodysplasies.

I.5.3. La cytochimie

Elle sert à confirmer l'origine myéloïde des blastes :

- Myéloperoxydases (MPO), méthode de référence à la diamino-benzidine. Ce résultat est significatif si le pourcentage de blastes MPO+ est ≥ 3 .

Les proliférations monoblastiques, certaines LAM très peu différenciées (M0) et les leucémies aiguës mégacaryoblastiques sont cependant MPO négatives. Il est alors nécessaire d'avoir recours au phénotypage.

- Estérases
 - Naphtol ASD acétate (NASDA) : ce test signe l'origine monocyttaire. Peu spécifique en soi, il prend sa valeur s'il est positif de façon intense et inhibé par le fluorure de sodium
 - Butyrate : ce test signe également l'origine monocyttaire
 - Chloracétate : ce test signe l'origine neutrophile et est positif sur les éosinophiles anormaux de la M4eo.

I.5.4. Immunophénotype (cytométrie en flux)

Il est fait dans tous les cas de LA et a un grand intérêt dans les LA peu différenciées ou biphénotypiques. Il permet, en s'aidant d'un nombre restreint d'anticorps, d'affirmer le caractère myéloïde (CD13, CD33, CD117, MPO intra-cytoplasmique), monoblastique (CD14), érythroblastique (GlycophorineA) ou mégacaryoblastique (CD42 et CD61) des formes peu différenciées de LA. Ce phénotypage permet aussi de reconnaître des formes biphénotypiques, grâce à l'expression associée de marqueurs myéloïdes et lymphoïdes. Plusieurs études ont montré que chez 50% des LAM de l'adulte au diagnostic (et au cours des rechutes) les blastes exprimaient la P-glycoprotéine de surface, produit du gène MDR1.

I.5.5. Cytogénétique

- d'intérêt majeur pour le pronostic et le traitement.
- la recherche de certaines anomalies spécifiques « récurrentes » peut présenter un intérêt diagnostique, dans certaines formes difficiles, à condition de recourir à des techniques rapides de type hybridation in situ ou PCR. Ainsi peuvent être mis en évidence les transcrits résultants de translocations spécifiques : CBF β /MYH11, PML/RAR α , AML1/ETO, les réarrangements de MLL et les duplications en tandem de la région juxtamembranaire de FLT3 ou les duplications de MLL pour ne citer que les anomalies ayant une valeur pronostique reconnue.

I.5.6. Bilan d'extension et des complications biologiques

- Ponction lombaire, surtout s'il s'agit d'une forme hyperleucocytaire ou d'une LAM4 ou LAM5.
- Bilan métabolique : Uricémie, kaliémie, calcémie, bilans rénal et hépatique
- Bilan d'hémostase complet :
 - Recherche d'un déficit des facteurs de la coagulation plasmatiques, lié à l'atteinte hépatique.
 - Recherche d'une CIVD (surtout s'il s'agit de LAM3, 4, 5 ou de formes hyperleucocytaires)
- Bilan immuno-hématologique (pré-transfusions et prégreffe)

I.6. Diagnostic différentiel

1- Leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL)

Si les formes présentent une morphologie indifférenciée, si MPO sont négatives, le diagnostic sera réalisé sur l'immunophénotypage.

2- Transformation de leucémie myéloïde chronique (LMC)

En cas de pourcentage de basophiles, de plaquettes élevés et d'une myélémie, le diagnostic est rendu sur la cytogénétique : t (9,22)/BCR-ABL+.

3- Myélodysplasie (MDS) ou leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC)

En cas de formes pancytopéniques, avec un pourcentage de blastes <20% et une forte dysmyélopoïèse, le diagnostic sera fait sur le suivi : progression (LAM) ou stabilité (MDS).

4- Aplasie médullaire

Pour les formes pancytopéniques et présentant une moelle pauvre au myélogramme, le diagnostic nécessitera une biopsie médullaire.

5- Régénérescence d'aplasie ou d'agranulocytose médicamenteuse.

I.7. Classification

Il est possible de classer les LAM en fonction de leur caractéristiques cytologiques, immunologiques, cytogénétiques, et parfois moléculaires. Parmi ces caractéristiques, ce sont surtout les caractéristiques cytogénétiques qui ont une valeur pronostique pour la réponse au traitement et la survie. L'incidence pronostique de ces anomalies cytogénétiques impose que tout prélèvement médullaire dans le cadre d'une suspicion de leucémie aigue chez un patient en âge de recevoir une chimiothérapie, comporte un caryotype. En effet, les traitements d'induction (pour les LAM 3) et les intensifications (indications d'allogreffes) sont en grande partie conditionnés par le caryotype.

Deux classifications majeures sont aujourd'hui utilisées :

1- La classification franco-américano-britannique (FAB) (Bennett et al., 1985; Bennett et al., 1991), subdivisée en 7 types. Cependant, cette classification appelle plusieurs remarques :

- le diagnostic de LAM0 ne peut être fait que par l'immunophénotype, mettant en évidence des marqueurs myéloïdes;
- cette classification n'incorpore pas les LA biphénotypiques ;
- le diagnostic de LAM6 peut se faire avec un total de moins de 30% de blastes médullaires.

2- Une nouvelle classification OMS des LAM a été récemment proposée (Vardiman et al., 2002). Dans cette classification, la limite pour parler de LAM n'est plus 30% mais 20% de blastes médullaires. Cette classification prend également en compte le caryotype, l'existence d'une dysmyélopoïèse portant sur toutes les lignées et le caractère induit par une chimiothérapie ou non.

I.7.1 Classification FAB

Sigle	Nom	Morphologie	%blastes	Cytochimie	Caryotype	fréquence	particularités	pronostic
M0	Myéloïde « indifférenciée »	Blastes non différenciés B1	> 30%	MPO <3% CD13/33/117...	Complexe Chr 5/7	5%	Sujet âgé Leucopénique	Mauvais
M1	Myéloblastique sans maturation	Blastes à cytoplasme basophile, sans B1 ou avec grains B2	=90%	MPO=3% CD34 /13/33		20%		
M2	Myéloblastique avec maturation	Blastes B1+B2 avec différenciation granuleuse (>10%) +/- corps d'Auer.	=30%	MPO ++	t (8 ,21)	30%		
M3	Promyélocytaire Variant	Promyélocytes dystrophiques, avec granulations volumineuses et fagots de corps d'Auer. Noyaux bilobés, majorité de blastes sans corps d'Auer.	=30%	MPO+++	t (15,17)	5%	<50 ans de novo CIVD, pancytopénique Hyperleucocytose	Bon Sensible ATRA
M4 M4eo	Myélo-monocytaire + éosinophiles	Mélange de blastes myéloïdes B1/B2 et de monocytes, dystrophiques ; Dans le sang, monocytes. + PN éosinophiles.	=30% >5.10 ⁹ /l	MPO+ NASDA inhib. NaF Chloracétate +	 Inv 16	15%	Leucocytose++ tropisme tissulaire post LMMC	Mauvais Chimiosens.
M5	monoblastique	Monoblastes, maturation monocytaire : M5a : non différenciée M5b : différenciée	=80% <80%	NASDA inhib. NaF	11q23 t(4,11) ;(9,1) (11,19)	10%	A : NRS, enfant B : post LMMC, chimio. Tropisme tiss /leucocytose	réservé
M6	Erythroleucémie	Myéloblastes médullaires (hors Eb) Erythroblastes médullaires	=30% =50%	Glycophorine MPO+	Complexe Chr 5/7	5%	Secondaire, Myélodysplasie	Mauvais
M7	Mégacaryoblastique	Mégacaryoblastes/cytes Myélofibrose		CD 41/CD61		Très rare	Chez NRS : trisomie 21 Chez adulte : secondaire	Chimiosens

I.7.2 Classification de l'OMS 2004

1- LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes

- LAM avec t (8 ; 21) (q22 ; q22) Réarrangement AML1/ETO
- LAM promyélocytaire avec t (15 ; 17) (q22 ; q11.12)
et ses variantes Réarrangement PML/RAR α
- LAM4 eosino, inv (16) (p13 ; q22) ou t (16 ; 16) (p13q11)
Réarrangement CBF β /MYH11
- LAM avec anomalie en 11q23 Réarrangement MLL

2- LAM avec dysmyélopoïèse portant sur toutes les lignées

- Avec SMD préalable
- Sans SMD préalable

3- LAM et SMD chimio-induits

- par agents alkylants
- par épipodophyllotoxine
- autres types

4- Autres types de LAM

- LAM peu différenciées
- LAM sans maturation
- LAM avec maturation
- Leucémies aiguës myélomonocytaires
- Leucémies aiguës monocytaires
- Leucémies aiguës erythroblastiques
- Leucémies aiguës mégacaryoblastiques
- Leucémies aiguës basophiliques
- Panmyéloses aiguës avec myélofibrose

I.8. Facteur pronostic

Les principaux facteurs pronostiques défavorables, clairement reconnus, dans les LAM sont :

- l'âge
- les antécédents de syndrome myélodysplasique ou de syndrome myéloprolifératif
- l'état général (index de performance)
- la leucocytose sanguine initiale
- l'expression du gène de résistance multiple aux chimiothérapies (MDR) (Legrand et al., 2001; Leith et al., 1999)
- une absence de réponse ou une réponse seulement partielle à une première cure de chimiothérapie d'induction.
- le caryotype (Grimwade et al., 2001; Slovak et al., 2000)

Il existe donc des corrélations entre les anomalies cytogénétiques et le pronostic.

Trois groupes sont décrits :

- anomalies de « bon pronostic » : t (15 ; 17), inv (16), t (8 ; 21)
- anomalies de « mauvais pronostic » : t (6 ; 9), inv (3), autres anomalies 3q, délétion 7 et 5, anomalie 17p, caryotype complexe (correspondant à plus de trois anomalies), t (9 ; 22)
- caryotype normal ou autre anomalie sans incidence pronostique reconnue.

Certaines anomalies ont une valeur pronostique variable comme les anomalies 11q23, le plus souvent cependant de mauvais pronostic.

L'importance pronostique de l'immunophénotype des cellules blastiques est plus discutée, à l'exception possible de l'expression de CD34 et de la P-glycoprotéine (protéine MDR). Récemment, a été mis en évidence la valeur pronostique des duplications des gènes FLT3 et MLL qui confèrent un risque de rechute significativement plus élevé.

I.9. Evolution

Elle ne se conçoit que sous traitement, dont le but est d'obtenir la rémission complète et d'éviter les rechutes.

La réponse s'apprécie sur les données de l'examen clinique, de l'hémogramme et du myélogramme (Cheson et al., 2003).

Définition de la rémission complète :

- Hémogramme et frottis sanguin : polynucléaires neutrophiles $\geq 1.10^9/l$; plaquettes $> 100.10^9/l$; pas de blastes leucémiques circulants.
- Frottis médullaire : cellularité $> 20\%$ avec maturation de toutes les lignées ; moins de 5% de cellules blastiques ; absence de corps d'Auer.
- Absence de localisation extra-médullaire.

En l'absence de RC, l'évolution est rapidement défavorable, mortelle en quelques semaines. L'obtention d'une première RC est une condition indispensable pour espérer une survie sans rechute prolongée, voire définitive. Les rechutes sont cependant fréquentes, survenant après une durée médiane de RC de 12 à 18 mois. Elles se traduisent par la réapparition du clone leucémique à partir de cellules blastiques médullaires résiduelles ou de sites extramédullaires.

I.10. Traitement

Le traitement des leucémies aiguës myéloblastiques repose essentiellement sur la chimiothérapie. Ce n'est que dans le cas très particulier de la leucémie aiguë promyélocytaire qu'il a été démontré que l'ajout à la chimiothérapie d'un facteur différenciant (ATRA) améliorait les résultats de la chimiothérapie. L'âge moyen des patients atteints de LAM est de 60 ans. De ce fait, et en raison de la toxicité accrue de la procédure au fil de l'âge, l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) ne concerne qu'environ 10% de l'ensemble des patients atteints de LAM.

I.10.1. Traitement d'induction

Il vise à réduire la masse de cellules blastiques jusqu'à un seuil non détectable, de façon à restaurer une hématopoïèse normale. En général, il est mis en route au diagnostic.

Le standard de la chimiothérapie d'induction consiste encore actuellement en l'association de la daunorubicine (45 à 60 mg/m²/j) et de l'aracytine (100 ou 200mg/m²/j). Le standard actuel est de « 3+7 » :

3 jours de daunorubicine et 7 jours d'aracytine. Ce type de chimiothérapie est suivi d'une phase d'aplasie qui dure 2 à 3 semaines et la rémission complète est obtenue dans 60 à 70 % des cas. Ceci constitue la référence, cependant il apparaît de plus en plus légitime de renforcer

le traitement d'induction chez les patients de moins de 50 ou 60 ans (Bishop et al., 1996; Weick et al., 1996). Par ailleurs, plusieurs nouvelles anthracyclines, la mitoxantrone et l'idarubicine, ont été comparées à la daurubicine sans apporter de conclusions déterminantes (1998).

I.10.2. Traitement de consolidation

- Chimiothérapie : C'est un traitement complémentaire de même type que celui d'induction, visant à réduire la masse de cellules leucémiques résiduelles pour augmenter les chances de plus longues RC. L'aracytine à forte dose pourrait permettre d'augmenter la durée des rémissions (Mayer et al., 1994).
- Allogreffe ou autogreffe : les résultats montrent peu ou pas de différence entre la chimiothérapie et l'autogreffe (Cassileth et al., 1998; Harousseau et al., 1997). L'allogreffe a, malgré la toxicité liée à la procédure, une meilleure efficacité en terme de survie sans maladie que l'autogreffe (Suciu et al., 2003).

I.10.3. Cas particuliers

Les indications et les traitements peuvent varier suivant plusieurs critères dont l'âge, le sous-type cytologique et cytogénétique de la leucémie.

- Le pronostic des LAM est, d'une façon générale, d'autant plus mauvais que le patient est plus âgé. Ceci est lié à une moins bonne tolérance des chimiothérapies et de l'aplasie et au caractère plus résistant de la leucémie chez les patients âgés, chez lesquels sont observés plus fréquemment des anomalies cytogénétiques et moléculaires de mauvais pronostic (Leith et al., 1997; Lowenberg, 1996). Les doses d'anthracycline doivent être réduites et l'idarubicine ou la mitoxantrone sont préférées à la daunorubicine. L'utilisation de G-CSF permet de raccourcir la phase d'aplasie.
- Le traitement va également varier suivant le sous-type cytologique et cytogénétique de la leucémie : la leucémie aigue promyélocytaire ou M3 dans la classification FAB, associée de façon spécifique et quasi constante à la translocation (15 ; 17), doit être traitée par l'association acide tout - trans rétinolique (ATRA à 45 mg/m²/j) et chimiothérapie (Warrell et al., 1993). Il est également bien établi qu'après l'obtention d'une RC par l'association précédente, une ou plusieurs cures de consolidations sont nécessaires, utilisant des anthracyclines. Après ceci, l'intérêt d'un traitement d'entretien par ATRA pour diminuer la

fréquence des rechutes a été démontré. Par ailleurs, le trioxyde d'arsenic est un traitement efficace des rechutes.

-Aucune chimiothérapie n'est satisfaisante pour les LAM associées à des anomalies cytogénétiques de « mauvais pronostic » (del 5, 7, anomalies complexes).

- Les LAM secondaires : elles ont un pronostic beaucoup plus défavorable que les LAM *de novo*. Une RC est obtenue chez la plupart des patients âgés de moins de 50 ans avec idarubicine, Ara-C à haute dose et étoposide. Une greffe est ensuite proposée à tous les patients ayant un donneur compatible apparenté ou non.

I.10.4. Traitement par allogreffe de moelle osseuse

L'allogreffe de moelle est réservée aux patients dont les chances de survie sans rechute sont inférieures sous chimiothérapie à celles attendues après allogreffe.

Allogreffes en RC1 (première rémission complète)

Sont exclues de façon consensuelle de cette indication, quel que soit le donneur :

- les LAM3 dont le pronostic sous chimiothérapie + ATRA est bon.
- Les LAM *de novo* avec inversion du 16 ou translocation (8 ; 21).

Elle est le meilleur traitement de la LAM *de novo*, en terme de guérison. Elle est réalisée lorsqu'il existe dans la fratrie un donneur HLA identique et que le patient est âgé de moins de 55 ans. Elle est pratiquée après conditionnement par association chimiothérapie à haute dose et irradiation corporelle totale. Les résultats sont meilleurs quand la greffe est faite précocement. Les causes de décès après greffe sont les rechutes et les complications liées à la greffe.

Indications d'allogreffe en RC2 ou en échec :

En présence d'un donneur géno-identique, l'indication d'une allogreffe en RC2 doit être discutée dans tous les cas, quel que soit l'âge, mais la durée de la première RC, et en conséquence la durée attendue de la seconde RC, est un élément à considérer chez les patients les plus âgés, pour mesurer le bénéfice attendu de la greffe versus la chimiothérapie.

I.10.5. Traitement par autogreffe

Elle est réalisée en l'absence de donneur HLA compatible permettant une greffe allogénique, ou en cas d'âge trop avancé pour une allogreffe (>55 ans). Elle est faite à titre d'intensification du traitement, dans les mois qui suivent la RC, à partir de cellules souches recueillies en sortie d'aplasie post chimiothérapie, sous G-CSF, après un conditionnement associant Endoxan* et irradiation corporelle totale ou Misulban* et Endoxan*. Effectuée

précocement en première RC ou encore en deuxième RC, l'autogreffe permet d'obtenir des résultats corrects en terme de survie. Elle n'empêche cependant pas les rechutes.

I.10.6. Traitement adjuvant

La correction de l'anémie est obtenue par transfusion de culots érythrocytaires ; la prévention des risques hémorragiques fait appel à la transfusion de plaquettes ; une prévention de l'insuffisance rénale est nécessaire.

Par ailleurs, étant donné la durée prolongée des neutropénies induites par les cures d'inductions et de consolidations, l'isolement des patients en milieu hospitalier pour réduire le risque d'infection bactérienne et fongique nosocomiales est justifié. En cas d'infection, un traitement antibiotique à large spectre est mis en route.

En ce qui concerne l'utilisation de facteurs de croissance, il n'est pas possible, dix ans après les premiers essais cliniques, en dehors de situations particulières à haut risque infectieux, de formuler des recommandations précises pour leur utilisation (Ozer et al., 2000).

I.10.7. Traitement des reprises évolutives

Le taux de guérison chez l'adulte est globalement de 20 à 30%. Les rechutes sont donc fréquentes. La reprise d'une chimiothérapie doit être discuté en fonction de l'âge, de l'état physiologique, de la tolérance observée lors des premiers traitements et le désir du patient.

Il peut comporter soit une nouvelle chimiothérapie semblable aux thérapeutiques classiques de première intention, soit une chimiothérapie à forte dose d'aracytine, soit des traitements investigationnels. Récemment le Mylotarg (anticorps monoclonal anti-CD33 : antigène présent sur la majorité des blastes myéloïdes) couplé à la calicheamycine (intercalant) a obtenu aux Etats-Unis une autorisation pour le traitement des rechutes des sujets de plus de 60 ans et est disponible en France en autorisation temporaire d'utilisation (ATU) (Sievers et al., 2001). D'autres inhibiteurs de farnésyl transférase (Zarnestra*) (Le Gouill et al., 2002) ou de tyrosine kinase (MLN518, PKC412, SU11248, CEP701 : inhibiteurs non spécifiques du récepteur FLT3) (O'Farrell et al., 2003; Stone et al., 2004) sont à l'étude. La liste des molécules en cours d'évaluation pré-clinique ou clinique tels que la rapamycine, les agents déméthylants (azacytidine), les inhibiteurs d'histone deacétylase (acide valproïque, (phényl)-butyrate, SAHA, FK228...) s'allonge chaque jour et promet de poser de réels problèmes de choix aux cliniciens (C. Récher, Hématologie, mai 2004).

I.11. Mécanismes moléculaires de la génèse des leucémies aiguës myéloblastiques

Les leucémies aiguës myéloblastiques (LAMs) sont des hémopathies malignes dérivées de progéniteurs hématopoïétiques de la lignée myéloïde bloqués à des stades variables de leur développement. La prolifération et l'accumulation de ces cellules immatures, appelées blastes, se traduisent par un envahissement de la moelle osseuse et du sang, et par une inhibition de l'hématopoïèse normale (Lowenberg et al., 1999).

Une organisation hiérarchique des populations de cellules leucémiques, proche de celle observée dans l'hématopoïèse normale a été récemment décrite. Des études ont montré que seules les cellules leucémiques de phénotype CD34+/CD38- ou CD34+/HLA-/DR+ seraient capables d'initier et de maintenir la croissance leucémique dans les modèles de souris NOD/SCID (Lapidot et al., 1994). Ces cellules sont définies comme des cellules souches leucémiques (CSL), faiblement prolifératives et ayant une capacité d'auto-renouvellement. Des données récentes montrent qu'il existe, comme pour les cellules souches hématopoïétiques (CSH) normales, une hétérogénéité dans la définition des CSL (Hope et al., 2004). Ces CSL semblent être majoritairement en phase G0/G1 du cycle cellulaire, et donc résistantes à la plupart des chimiothérapies actuellement disponibles en clinique, qui n'agissent que sur les cellules en phase de synthèse d'ADN.

Deux types d'événements oncogéniques majeurs semblent devoir coopérer pour conduire au développement d'une LAM (Gilliland and Tallman, 2002):

A/ Des altérations génétiques touchant des gènes codant pour des facteurs de transcription. Dans les LAM *de novo*, plusieurs translocations chromosomiques récurrentes ont été décrites qui entraînent la production de protéines de fusion chimériques (translocation (8,21) (q22; q22) conduisant à la synthèse de la protéine de fusion AML1-ETO, inversion du chromosome 16 (p13; q22) correspondant à la protéine chimérique CBF β -MYH11, et translocations multiples impliquant le gène MLL situé en 11q23). Ces protéines de fusion oncogéniques agissent comme des facteurs transcriptionnels aberrants capables d'interférer avec les mécanismes normaux de régulation de la croissance, de la différenciation et de la survie des progéniteurs hématopoïétiques. Plus récemment, des mutations dans certains gènes codant pour des facteurs de transcription myéloïdes (CEBP α , MLL, GATA 1, et PU 1) ont également été décrites dans des LAM *de novo*. L'altération de la fonction de tels facteurs de transcription semble responsable du blocage de la différenciation cellulaire.

B/ Des mutations qui confèrent un avantage prolifératif et une résistance à l'apoptose du clone malin. Ainsi, des altérations du gène codant pour le récepteur membranaire FLT3 à activité tyrosine kinase intrinsèque (RTK) (duplications en tandem de la région juxta-membranaire ou mutation ponctuelle du codon asparagine 835), conduisant à une activation constitutive du récepteur, sont retrouvées dans environ 30% des LAMs (Gilliland and Griffin, 2002). De même, des mutations activatrices des gènes codant pour le récepteur du Stem Cell Factor (SCF) c-kit (CD117), le récepteur FMS (CSF-1 receptor) et les protéines Ras (N-Ras et K-Ras) ont été décrites dans 5%, 5-20% et 10-15% des LAMs respectivement. Ces mutations conduisent à une activation constitutive des récepteurs et des voies de signalisation situées en aval. La caractérisation de telles anomalies moléculaires a déjà permis le développement d'inhibiteurs chimiques plus ou moins spécifiques, capables de contrôler la prolifération tumorale (Mohi et al., 2004).

Une autre façon d'aborder la biologie des LAMs est d'étudier directement les voies de signalisation impliquées dans la survie et la prolifération des cellules leucémiques (Dash and Gilliland, 2001). De cette façon, une activation constitutive des protéines de la famille STAT (pour Signal Transduction and Activator of Transcription) a été identifiée dans les blastes de LAM. L'activation constitutive de STAT3 ou de STAT5 constituerait un facteur de mauvais pronostic (Benekli et al., 2003; Gouilleux-Gruart et al., 1996). De même, une activation constitutive de la voie ERK/MAPK est souvent observée dans les LAM *de novo*. L'inhibition de cette voie par des inhibiteurs chimiques réduit la prolifération des cellules leucémiques, ainsi que leur clonogénicité et induit leur apoptose. Les mutations activatrices de N-Ras et à un moindre degré de K-Ras, fréquentes dans les LAM primitives, pourraient expliquer en partie cette activation des MAPK, mais leur rôle dans la leucémogénèse est encore mal connu (Milella et al., 2001). Enfin, la voie de signalisation NF- κ B est activée constitutivement dans les CSL de phénotype CD34+/CD38-/CD123+ (Guzman et al., 2001), ce qui n'est pas le cas dans les cellules souches hématopoïétiques normales. Son inhibition par le MG132, un inhibiteur du protéasome, induit une apoptose sélective des CSL sans effet sur les CSH normales, permettant d'envisager une action thérapeutique ciblée sur les CSL.

La compréhension des mécanismes d'activation de ces voies et la démonstration de leur implication dans la biologie de la maladie devraient permettre de développer des thérapeutiques novatrices, capables d'inhiber spécifiquement ces relais.

I.12. Les voies PI3K/Akt et mTOR/P70S6K/4E-BP1

I.12.1. La voie PI3K/Akt

L'activation d'Akt par la phosphoinositide 3 kinase (PI3K) joue un rôle essentiel dans la régulation des processus de survie et de croissance cellulaire. Depuis quelques années, il a été montré que des composants de cette voie de signalisation sont fréquemment altérés dans de nombreux cancers humains. Dans les cellules hématopoïétiques, la voie PI3 kinase/Akt peut être activée en réponse à de nombreuses cytokines hématopoïétiques et chimiokines. Ceci a permis d'émettre l'hypothèse que cette voie de signalisation pourrait également jouer un rôle dans la survie et la prolifération des blastes de LAMs. De ce fait, le laboratoire a étudié l'activation de la voie PI3K/Akt dans ces cellules blastiques, qui n'a été décrite que très récemment et de façon partielle (Xu et al., 2003).

Les PI3K de classe Ia peuvent être activées en aval des RTK ou des récepteurs de la superfamille des récepteurs de cytokines, ou encore par association directe de la sous unité catalytique des PI3K aux protéines Ras activées. Ce sont des lipide kinases constituées de deux sous unités: une sous unité régulatrice de 85 kDa, la p85, et une sous unité catalytique de 110 kDa, la p110. Il existe trois isoformes de la p110: p110 α , β , et δ . Parmi ces isoformes, la p110 δ est connue pour son expression préférentielle dans les cellules hématopoïétiques, notamment dans les leucocytes. Le complexe p85/p110 est activé, soit directement, par association aux récepteurs membranaires (par exemple, les RTK), soit indirectement, par l'intermédiaire d'adaptateurs moléculaires, dont les protéines adaptatrices de la famille IRS et de la famille GAB.

Les PI3K phosphorylent l'anneau inositol des phosphatidylinositides 4-5 bisphosphate en position 3', générant la formation de phosphatidylinositides 3-4-5 trisphosphate (PIP3). Ce phospholipide permet le recrutement et l'activation dans la région sous membranaire de certaines protéines possédant un domaine PH (Pleckstrin Homology), parmi lesquelles les sérine/thréonine kinases PDK-1 (PIP3 Dependent-Kinase) et Akt (ou PKB) (Datta et al., 1999). Akt joue un rôle majeur dans le contrôle de la survie et de la prolifération cellulaire.

La stimulation de la voie PI3K est très finement régulée. Ainsi, PTEN (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) et SHIP-1 (Src-homology 2 (SH2) domain-containing phosphatase), sont des lipide phosphatases qui déphosphorylent le PIP3 en position 3' et 5', respectivement, et limitent l'activation d'Akt (Myers et al., 1998). La perte de

fonction de PTEN, par délétion ou mutation, est oncogénique et conduit à l'activation constitutive de la voie PI3K/Akt (Cantley and Neel, 1999).

I.12.1.1 Effets anti-apoptotiques de la voie PI3K/Akt.

Les effets anti-apoptotiques de la protéine Akt passent essentiellement par quatre effecteurs :

- Le facteur de transcription FOXO 3a (autrement appelé FKHRL1). La phosphorylation par Akt de FOXO 3a fait apparaître une séquence de fixation des protéines 14-3-3, et conduit à son export du noyau vers le cytoplasme. FOXO 3a ne peut donc plus transactiver ses gènes cibles dont le ligand de Fas, la protéine à fonction pro-apoptotique Bim (protéine de structure BH2-only) et l'inhibiteur du cycle cellulaire p27^{kip1} (Brunet et al., 1999; Tran et al., 2003).
- Bad, dont la phosphorylation inhibitrice par Akt sur la sérine 136 l'empêche d'interagir avec Bcl2 ou Bcl-X_L, qui retrouvent alors leurs fonctions anti-apoptotiques au niveau mitochondrial (Datta et al., 1997).
- La protéine suppresseur de tumeur p53. L'ubiquitine ligase mdm2 subit une translocation nucléaire déclenchée par la phosphorylation de la sérine 186 par Akt. Mdm2 nucléaire s'associe avec p53 et l'adresse au protéasome pour dégradation (Mayo and Donner, 2001).
- La voie NF-κB. Akt active par phosphorylation la kinase IKK ce qui entraîne la dégradation par le protéasome de IκB et la translocation nucléaire de NF-κB (Romashkova and Makarov, 1999).

Les cibles et le rôle d'Akt dans la survie cellulaire

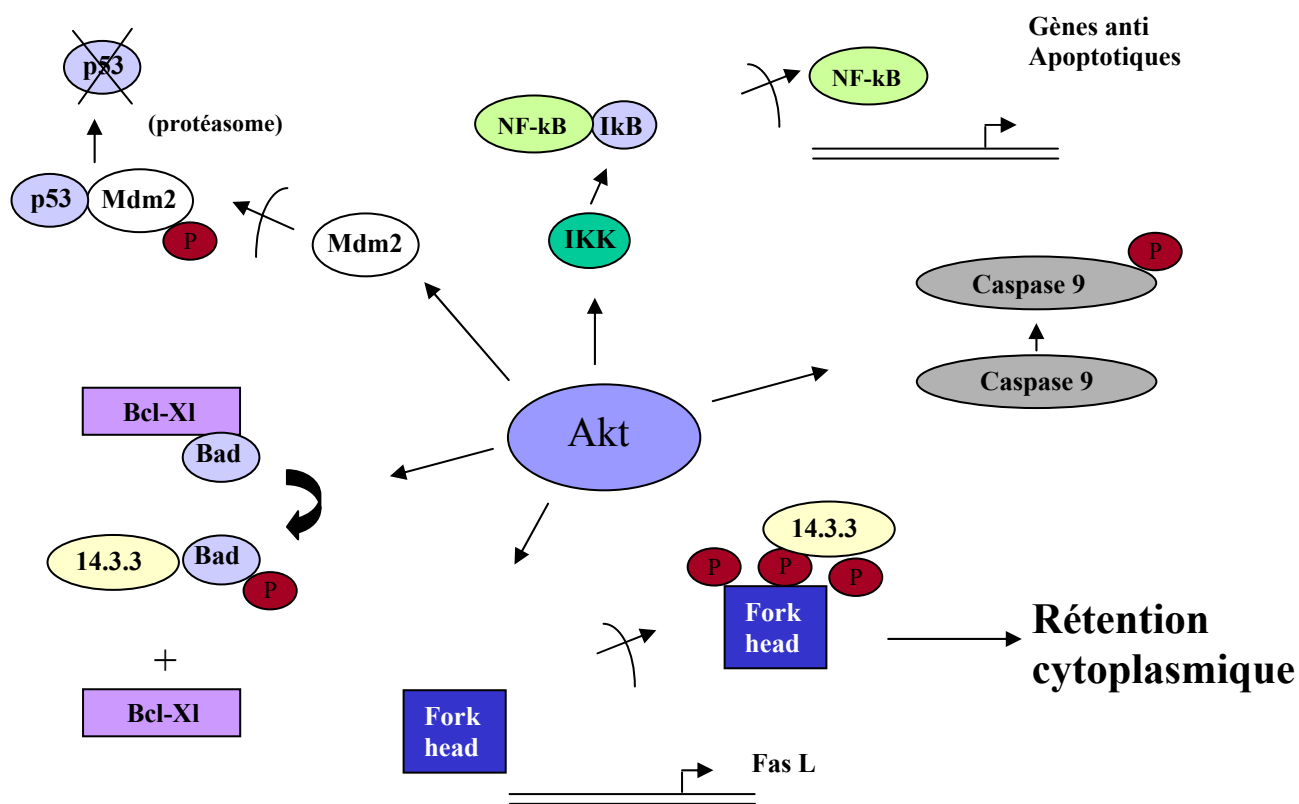


Schéma 1 : Les cibles et le rôle d'Akt dans la survie cellulaire

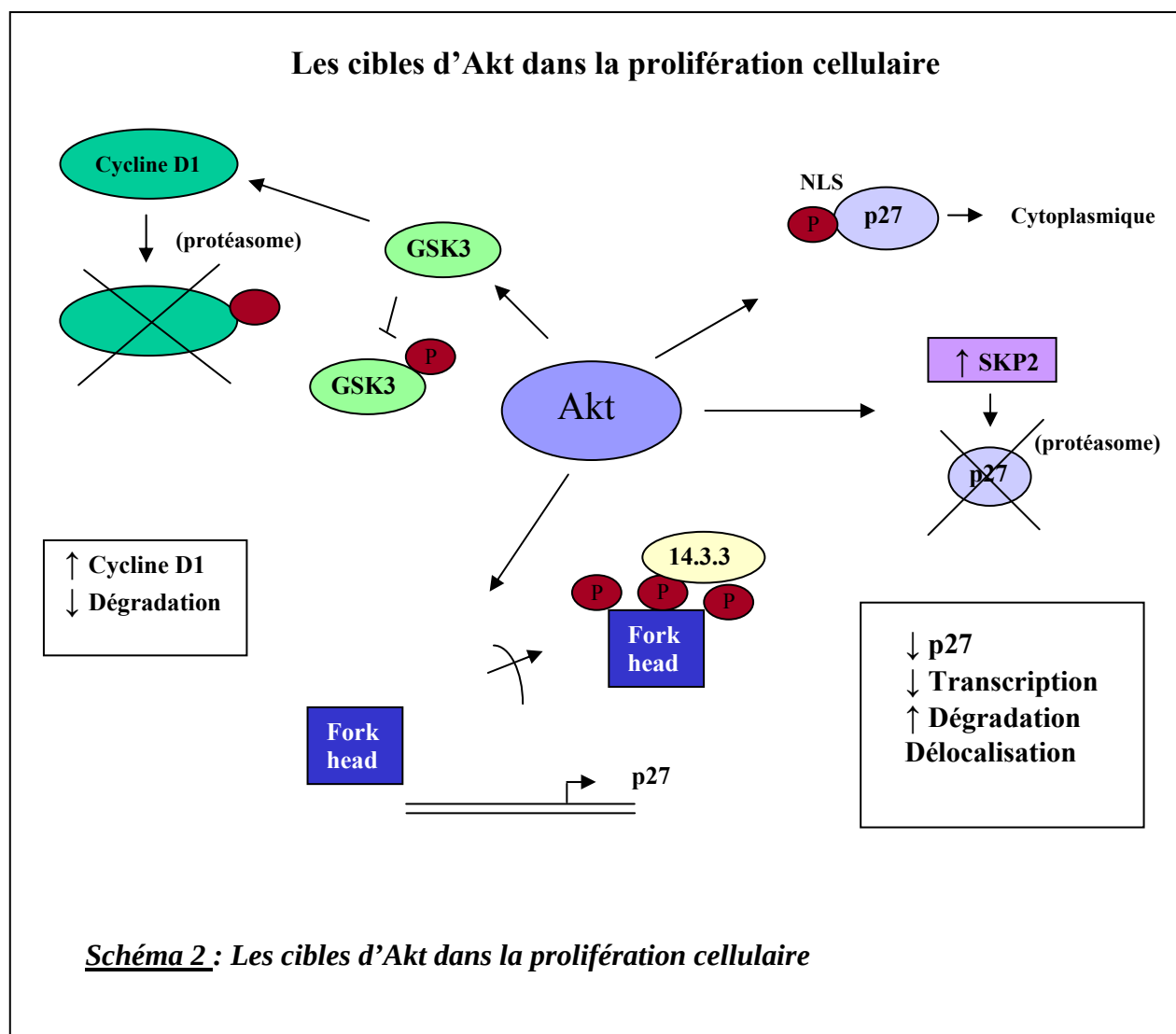
I.12.1.2 Effets mitogéniques de la voie PI3K/Akt.

La stimulation par Akt de la division cellulaire passe essentiellement par deux voies (Brazil et al., 2004) :

- Akt régule négativement la fonction de la protéine p27^{kip1}, inhibitrice du complexe cycline E / cdk2. Cette régulation se fait à plusieurs niveaux : a/ inhibition transcriptionnelle via l'inhibition de FOXO 3a ; b/ stimulation de sa dégradation via la régulation positive de l'expression de l'ubiquitine ligase SCF^{SKP2} qui adresse p27^{kip1} au protéasome (Bouscary et al., 2003); c/ modulation de sa localisation cellulaire puisque la phosphorylation de

p27^{kip1} sur la thréonine 157 par Akt induit sa séquestration dans le cytosol (Graff et al., 2000; Liang et al., 2002).

- Akt inhibe la protéine GSK3 β en la phosphorylant et empêche ainsi la dégradation de la cycline D1 par le protéasome, favorisant ainsi l'entrée dans le cycle cellulaire.



I.12.1.3 Implications en oncogénèse.

L'activation constitutive de la voie PI3K/Akt a été décrite dans de nombreux cancers. Ainsi, des mutations ou délétions inactivatrices de la phosphatase PTEN sont observées dans des cancers de l'ovaire, du sein, de l'endomètre, du poumon, de la thyroïde, ainsi que dans des carcinomes hépatocellulaires ou des glioblastomes. De plus, des tumeurs où l'activité kinase

d'Akt est augmentée par d'autres mécanismes ont été décrites : a/ la surexpression d'Akt₁ et d'Akt₂ par amplification génomique 19q13.1-q13.2 (ovaire, pancréas, sein, estomac) b/ l'amplification du locus PIK3CA codant pour p110 α (ovaire,utérus) c/ des mutations du locus PIK3CA de p110 α dans 30% des cancers colorectaux sporadiques d/ des mécanismes d'autocrinie (Vivanco and Sawyers, 2002). Enfin, l'activation de récepteur à activité kinase comme Erb2 a été observée dans le cancer du sein.

I.12.2. La voie mTOR/P70S6K/4E-BP1

I.12.2.1 Structure de la protéine mTOR



Schéma 3: Structure de mTOR. La protéine mTOR est constituée d'un domaine kinase catalytique (CD), d'un domaine de liaison au complexe FKBP12-rapamycine (FRB), un domaine auto-inhibiteur putatif (RD), de 20 séquences répétées HEAT à l'extrémité N-terminale, un domaine FAT (FRAP-ATM-TRRAP) et un domaine FATC en C-terminal.

La protéine humaine mTOR est codée par un gène situé sur le chromosome 1. Elle est composée de 2549 acides aminés et son poids moléculaire est de 289 kDa (Gingras et al., 2001) (Fingar and Blenis, 2004). La structure générale des protéines mTOR comprend :

- un domaine catalytique

Celui-ci se situe dans la région C-terminale et est similaire au domaine catalytique de la PI3K.

- la région FRB

Le site de liaison à la rapamycine (au complexe Rapamycine-FKBP12) est localisé immédiatement en amont du domaine catalytique, dans la région FRB (FKBP12-rapamycine binding domain).

- le domaine FAT

En amont de FRB, ce domaine existe également dans d'autres protéines de la famille

PIKK (phosphoinositide kinase kinase), avec quelques différences. Il est appelé domaine effecteur toxique, car sa surexpression dans les levures conduit à l'arrêt du cycle en G1.

- le domaine FATC

Ce domaine est similaire à toutes les régions C-terminales des membres de la famille PIKK. Son importance est révélée par le fait que la délétion d'un seul acide aminé supprime l'activité mTOR, sans explication connue.

- les HEATS

La région comprise entre le domaine FAT et la région N-terminale contient 20 séquences répétées HEAT (Huntington-elongation factor 1A-PP2A A subunit-TOR). Un arrangement adapté de chacune de ces séquences permet des interactions protéines-protéines.

Des données récentes suggèrent que mTOR fait partie d'un système plus large de signalisation comprenant les protéines raptor et mLST8: raptor, en se liant à mTOR semble faciliter la phosphorylation de certains substrats ; mLST8 interagit avec le domaine kinase de mTOR (Schalm and Blenis, 2002) (Yonezawa et al., 2004).

1.12.2.2 Localisation intracellulaire de la protéine mTOR

La plupart des protéines mTOR sont associées aux microsomes : dans plusieurs lignées cellulaires humaines, mTOR se situe en périphérie du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi (Drenan et al., 2004). Par microscopie à immunofluorescence confocale, la partie majoritaire de mTOR apparaît être nucléaire, dans les fibroblastes humains et plusieurs lignées cellulaires humaines (Zhang et al., 2002). Ces tableaux différents pourraient être expliqués par une distribution de mTOR qui change en fonction des variables expérimentales.

1.12.2.3 Les conséquences de l'activation de mTOR : fonctions.

mTOR (Target Of Rapamycin) est une sérine/thréonine kinase, très conservée au cours de l'évolution. La voie TOR est impliquée dans la croissance, la prolifération, et la survie cellulaire (Bjornsti and Houghton, 2004b). Son rôle essentiel s'exerce sur la régulation de la biosynthèse protéique, notamment par l'initiation de la traduction.

L'activation de la voie mTOR en aval des récepteurs membranaires est médiée par la voie PI3K/Akt (Alessi et al., 1998). mTOR est phosphorylée directement par Akt. D'autre part, Akt contrôle indirectement l'activation de mTOR en agissant sur un complexe formé par les protéines TSC1 (Hamartine) et TSC2 (Tubérine) qui inhibe l'activité de la petite protéine G

de la famille Ras, dénommée Rheb (Ras homolog enriched in brain). Rheb, sous forme GTP, active directement mTOR. La régulation de l'activité de mTOR par Akt a été récemment élucidée (Li et al., 2002): TSC2 possède, lorsqu'elle est non phosphorylée et associée à TSC1, une fonction de type GAP (GTPase-activating protein) et maintient Rheb sous forme inactive, liée au GDP (Inoki et al., 2003). En revanche, la phosphorylation de TSC2 par Akt conduit à sa dégradation par le protéasome (Plas and Thompson, 2003) et/ou à sa séquestration par les protéines 14-3-3 (Meek et al., 2004). TSC2 perd alors sa fonction GTPase intrinsèque: Rheb est sous forme liée au GTP et active mTOR. Une dérégulation de cette voie à différents niveaux, par augmentation de l'activité PI3K/Akt régulant TSC2, par mutations inactivatrices de TSC2 ou de TSC1 (comme dans la sclérose tubéreuse de Bourneville), ou encore par surexpression de Rheb, prédispose à une transformation cellulaire.

En effet, chacune de ces altérations conduit à une activation de mTOR qui contrôle l'initiation de la traduction par 2 voies distinctes:

- 1- La phosphorylation et l'activation de la protéine ribosomale P70S6K (S6K1)
- 2- La formation du complexe traductionnel eIF4F, régulé par la protéine 4E-BP1 (eIF4 Binding Protein 1).

Cette voie contrôle l'initiation de la traduction des ARNm cap-dépendants. La protéine 4E-BP1 régule la formation du complexe multiprotéique eIF4F: sous forme non phosphorylée par mTOR, 4E-BP1 est associée au facteur d'initiation eIF4E. Cette association 4E-BP1/eIF4E empêche la liaison de eIF4E à la protéine eIF4G de manière compétitive et prévient la formation du complexe eIF4F actif. En revanche, l'activation de la voie mTOR permet la phosphorylation de 4E-BP1 sur 6 résidus sérine/thréonine de façon séquentielle. Ainsi, hyperphosphorylé 4E-BP1 perd son affinité pour le facteur eIF4E, entraînant sa libération et la formation du complexe eIF4F qui conduit à l'initiation de la traduction.

1.2.2.4 Les inhibiteurs de la voie mTOR

La rapamycine et de nouveaux dérivés comme le Rad-001 (Novartis) et le CCI779 (Wyeth) inhibent spécifiquement l'activité kinase de mTOR. La rapamycine est un macrolide qui présente des propriétés antifongiques, immunosuppressives et anti-tumorales. En effet, après fixation à FKBP12, le complexe rapamycine-FKBP12 se lie au domaine FRB de mTOR et inhibe la fonction kinase de cette dernière (Harris and Lawrence, 2003). Ainsi, en inhibant la phosphorylation des cibles de mTOR, la rapamycine inhibe la synthèse protéique, et provoque un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et un arrêt de la croissance cellulaire. Elle posséderait également un rôle antiangiogénique (par l'intermédiaire de Hif-1 α et VEGF).

Plusieurs travaux récents suggèrent que l'activation de la voie mTOR, en aval de l'activation de la voie PI3K, pourrait avoir un rôle oncogénique (Ruggero et al., 2004). De plus, l'inhibition de la voie mTOR, par la rapamycine, permettrait de sensibiliser des tumeurs chimiorésistantes à l'action apoptotique de ces drogues (Wendel et al., 2004). Plus récemment encore, le rôle d'une dérégulation des mécanismes de traduction cap-dépendants, par activation de la voie mTOR (ou par surexpression de eIF4E, voire de eIF4G), a été suggéré constituer un évènement transformant dans la genèse du cancer du sein (Avdulov et al., 2004), notamment par le contrôle de la survie cellulaire et de la traduction de gènes cibles tels que cycline D1, Myc, Hif-1 α (Majumder et al., 2004).

I.13. But du travail

Des travaux récents ont montré qu'il existe une activation constitutive de la voie PI3K/Akt dans les LAMs (Sujobert et al, soumis pour publication) (Xu et al., 2003). Au laboratoire, ceci a été démontré dans 50 % des cas de LAMs *de novo* par analyse en immunoempreinte de la phosphorylation d'Akt (Ser 473) et de FOXO3a (Thr 32). Chez les patients ayant une activation constitutive de la voie PI3K (patients PI3K+), une phosphorylation constitutive des protéines adaptatives de la famille GAB est détectée. La phosphorylation sur tyrosine de ces adaptateurs, témoigne de l'activation d'une kinase, située en amont. Le travail de P. Sujobert a montré que cette kinase activée constitutivement n'est pas le récepteur FLT3, et reste à identifier. Il a également été montré que les phosphatases PTEN et SHIP-1 sont normalement exprimées dans les cellules blastiques. Cela rend peu probable l'implication de ces gènes « suppresseur de tumeur » dans les LAMs, bien que la présence de mutations ponctuelles inactivatrices de leur fonction lipide-phosphatase ne puissent être absolument exclue. Cependant la plupart des mutations de *PTEN* décrites à ce jour dans les cancers entraînent la production d'une protéine tronquée, non détectée chez nos patients (Cantley and Neel, 1999; Luo et al., 2003).

Par ailleurs, l'activation constitutive de la voie PI3K confère un avantage prolifératif aux cellules blastiques *in vitro*. Enfin le LY294002, un inhibiteur non spécifique de la PI3K, inhibe la prolifération et induit l'apoptose des cellules blastiques.

Dans mon travail de DEA, j'ai confirmé l'activation de la voie PI3K/Akt par immunofluorescence en microscopie confocale et analyse de la phosphorylation d'Akt dans les blastes CD34+ en cytométrie de flux. J'ai ensuite étudié l'expression des différentes

isoformes de la sous unité catalytique p110 des PI3K de classe Ia dans les cellules blastiques de LAM. La p110 δ est exprimée presque exclusivement dans les cellules d'origine hématopoïétique (Vanhaesebroeck et al., 1997). J'ai pu montrer que seule l'isoforme p110 δ est constamment exprimée dans les cellules blastiques de LAMs. Un inhibiteur spécifique de la p110 δ , l'IC87114 (ICOS Corporation) (Sadhu et al., 2003b) supprime complètement la phosphorylation d'Akt dans les cellules blastiques, et inhibe la prolifération des blastes PI3K+ sans induire leur apoptose. En revanche, l'IC87114 n'inhibe pas la prolifération des cellules CD34+ de sang de cordon en présence de SCF, FL et Tpo, ni la clonogénicité des progéniteurs érythroïdes et myéloïdes issus de cellules CD34+.

Je me suis intéressée dans un second temps à l'activation de la voie mTOR/P70S6K/4E-BP1 dans les cellules blastiques. J'ai montré, par l'étude de la phosphorylation des protéines P70S6K et 4E-BP1, que la voie mTOR est constitutivement activée dans les LAMs et que l'inhibition spécifique de mTOR par la rapamycine contrôle la prolifération des cellules blastiques (Bjornsti and Houghton, 2004b).

Surtout, j'ai pu observer que l'activation de mTOR dans ces cellules est indépendante de l'activation de la voie PI3K, expliquant l'effet additif observé sur l'inhibition de la prolifération des blastes lorsqu'on associe l'IC87114 à la rapamycine. Ainsi, le contrôle de l'activation de la voie mTOR en aval d'Akt, largement décrit dans d'autres modèles, n'est pas retrouvé dans les LAMs.

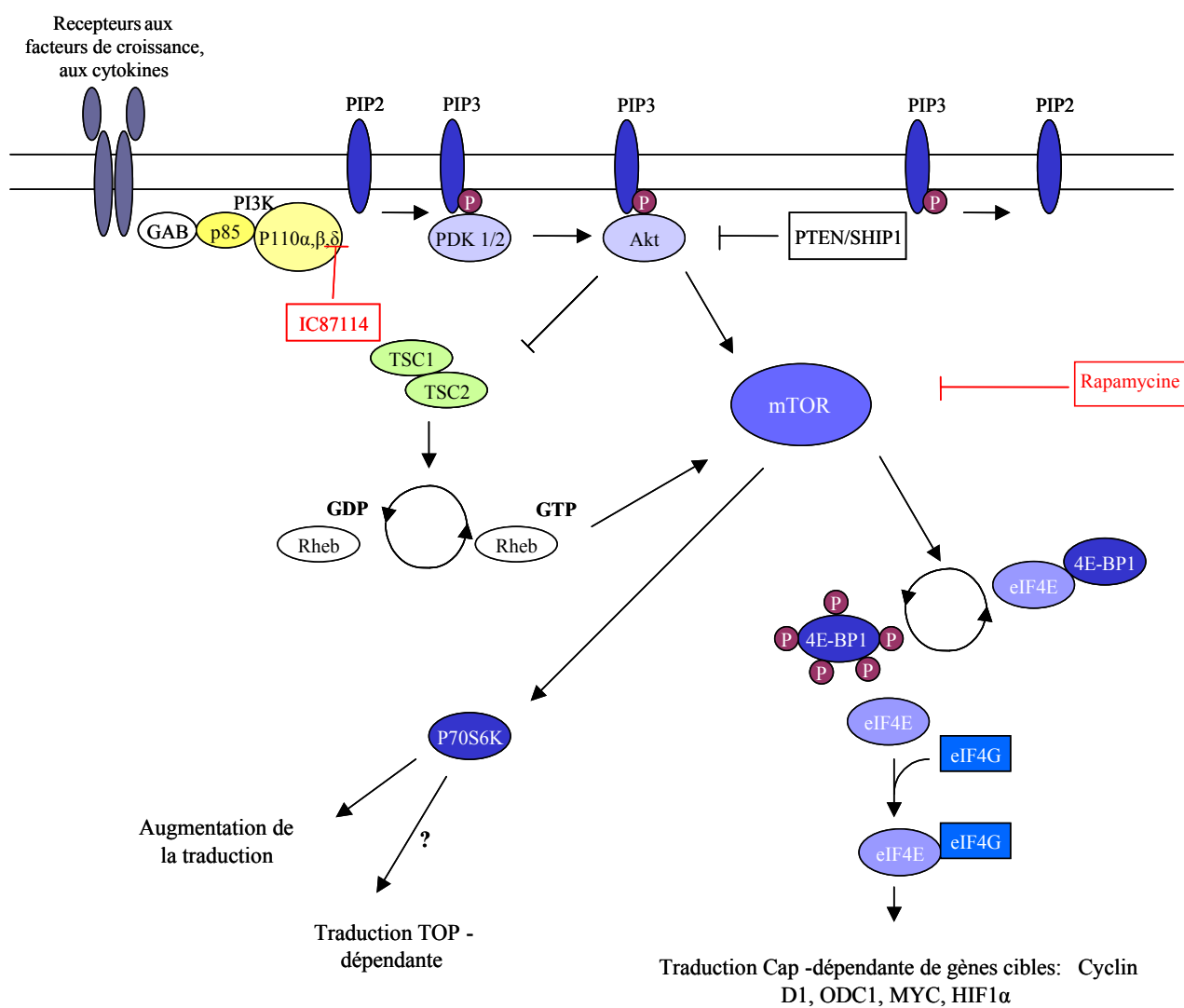


Schéma 4: Schéma de la voie PI3K/Akt/mTOR (Bjornsti and Houghton, 2004a).

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. Patients

L'étude présentée a porté sur 64 patients: 54 patients porteurs de LAM *de novo*, 10 patients porteurs de LAM secondaires à une myélodysplasie. Le recrutement des patients porteurs de LAM *de novo* est effectué dans le cadre du protocole multicentrique français LAM2001 / GOELAMS; les patients porteurs de LAM secondaires sont issus du service d'hématologie du Pr. F.Dreyfus, à l'hôpital Cochin. Les patients porteurs de leucémies aiguës à promyélocytes (LAM3), ou de LAM6 et LAM7 selon la classification FAB, sont exclus de l'étude. Les types FAB des LAMs des patients inclus se répartissent de la façon suivante: LAM0 (n=8), M1 (n=10), M2 (n=21), M4 (n=10), M4eo (n=2), M5(n=11), type inconnu (n=2). Il s'agit de 26 femmes et 38 hommes, d'âge moyen 52 ans.

Les patients ont été informés de leur inclusion dans cette étude biologique, et leur consentement a été recueilli conformément aux lois de bioéthique. Un à deux ml de moelle osseuse sur milieu de Hanks hépariné ou vingt à trente ml de sang sur EDTA sont prélevés au moment du bilan diagnostique, avant tout traitement par chimiothérapie. Les prélèvements arrivent dans les 24-48 heures à l'Institut Cochin. Selon l'heure de réception, ils sont traités immédiatement ou incubés après dilution au demi en milieu de culture contenant 10% de sérum toute la nuit à 37 °C, et traités le lendemain matin.

II.2. Purification des blastes

Le prélèvement de moelle osseuse ou de sang est dilué au demi en milieu de déprivation (DMEM modifié selon Iscove complété avec 0.4% BSA, 20 µg/ml Transferrine, 10 UI/ml Pénicilline, 10 µg/ml Streptomycine) et soumis à une centrifugation sur gradient de Ficoll (129g, 30 min) à température ambiante. L'anneau correspondant aux cellules mononucléées est ensuite prélevé et lavé deux fois dans du milieu de déprivation. Si nécessaire, une lyse des globules rouges est effectuée par un choc hypotonique dans une solution d'ACK (155mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0.1mM EDTA) : les culots sont repris dans 2ml de PBS pour 8 ml d'ACK, agités doucement pendant une min à 37°C, centrifugés et lavés deux fois en milieu de déprivation. Les culots cellulaires sont alors repris dans du milieu de

déprivation préalablement chauffé à 37°C au bain-marie. La viabilité des cellules est estimée par une coloration au bleu Trypan de façon à n'étudier que les prélèvements ayant plus de 90% de cellules viables, ce qui était le cas pour tous les patients présentés dans cette étude. Le pourcentage de blastes après Ficoll est mesuré par comptage des cellules blastiques sur étalement par cyto-centrifugation après coloration au May-Grünwald-Giemsa .

II.3. Cyto-centrifugations

Après Ficoll, les cellules mononucléées obtenues sont mises à 10^5 /ml en milieu de déprivation pendant 4 heures à 37°C. Des cyto-centrifugation (400 rpm, 5 min) sont alors réalisées à partir de 2.10^4 cellules. Les lames sont séchées 30 min à température ambiante, puis emballées dans de l'aluminium et congelées à -20°C à l'abri de la lumière et de l'humidité. Une des lames cytocentrifugées est colorée au MGG pour décompte des blastes.

II.4. Biochimie

II.4.1. Anticorps utilisés

Pour l'hybridation, les anticorps reconnaissant les formes phosphorylées des protéines de signalisation sont dilués dans une solution de BSA 5% dans du TBS-Tween, et les anticorps reconnaissant les protéines sous leur forme native sont dilués dans une solution de lait 5% dans du TBS-Tween.

Les anticorps anti phospho Akt (Ser 473), anti phospho P70S6K (Thr 389), et anti phospho 4E-BP1 (Ser 65) proviennent de Cell Signaling. L'anticorps anti 4E-BP1 a été obtenu auprès du Dr Sonenberg (Mc Gill Cancer Centre, Canada).

L'anticorps anti phospho FOXO 3a (Thr 32) provient de Upstate Biotechnologies. Les anticorps anti P70S6 kinase, anti PI3-kinase p110 α et p110 β proviennent de Santa Cruz. L'anticorps anti PI3-kinase anti p110 δ a été obtenu auprès du Dr Vanhaesebroeck (Ludwig Institute for Cancer Research, UK). L'anticorps anti-actine provient de Sigma.

II.4.2. Préparation des lysats cellulaires

Après Ficoll, les cellules sont lavées deux fois en milieu de déprivation et concentrées à 10^7 /ml en milieu de déprivation à 37°C pendant quatre heures. A l'issue de ces quatre

heures, elles sont soit laissées en milieu de déprivation seul, soit incubées pendant 35 min avec des inhibiteurs des voies de signalisation étudiées : LY 294002 (50 μ M) (Sigma), inhibiteur des PI3Ks; rapamycine (50ng/ml) (Sigma), inhibiteur de mTOR; IC87114 (10 μ M) (ICOS corporation, Bothell, WA,USA), inhibiteur de la sous unité p110 δ de la PI3K, soit stimulées 15 min par du SCF (30ng/ml) ou du FLT3 Ligand ou FL (50ng/ml). Toutes ces étapes se passent à 37°C. La signalisation est ensuite brutalement stoppée par dilution dans 3 volumes de PBS glacé, puis les cellules sont centrifugées à 4°C (129g, 10 min). Les cellules sont lysées en tampon Laemmli bouillant (0.625 mM Tris-HCl, 1% SDS, 5 % Glycerol, 0.002% de bleu de bromophénol, 1 mM Vanadate, 5% β mercaptoéthanol, pH 6.8) à raison de 50 μ l par million de cellules.

II.4.3. Immuno-empreintes

Les extraits protéiques sont dénaturés par chauffage à 100°C dans du tampon Laemmli. La séparation des protéines, selon leur poids moléculaire, s'effectue par migration électrophorétique (40 V, 45 mA) sur gel de polyacrylamide (5% à 15% selon le poids moléculaire des protéines étudiées) ou sur gel acrylamide/bis-acrylamide (30:0.3), migration électrophorétique (240 V, 50mA), pour observer le retard de migration électrophorétique des protéines. Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose par un champ électrique (1h30, 100 V, 4°C) dans du tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20% Ethanol, 0.01% SDS). La membrane est colorée au Rouge Ponceau pour révéler les marqueurs de poids moléculaire et incubée 1 heure en solution de blocage (5% de lait dans une solution de TBS :10mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4, et 0.1% Tween 20) à température ambiante. La membrane est hybridée pendant 12 heures avec l'anticorps primaire à 4°C. Après 5 lavages en TBS-Tween, la membrane est incubée pendant 1 heure avec un anticorps anti IgG de lapin ou de souris, couplé à la peroxydase (Cell Signaling). La membrane est lavée 5 fois en TBS-Tween avant révélation par chimioluminescence (ECL, Amersham Pharmacia Biotech®, ou Supersignal). Les membranes peuvent être hybridées plusieurs fois après déshybridation en solution de déshybridation (100 mM β mercaptoéthanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8) pendant 30 min à 56°C, en agitation, puis 5 lavages en TBS-Tween.

II.5. Purification des cellules CD34 + de sang placentaire

Les cellules CD34 + ont été purifiées selon la méthode décrite par Freyssinier et al. Les échantillons de sang placentaire obtenus après consentement maternel, sont dilués dans 50 ml de tampon phosphate contenant 1 % de BSA (StemCell Technologies, Vancouver, Canada) puis subissent une centrifugation sur gradient de Ficoll. Les cellules de faible densité sont récupérées et les cellules CD34 + sont recueillies après deux cycles de sélection positive à l'aide de billes immunomagnétiques (MACS, CD34 isolation kit, Miltenyi Biotec). La purification est contrôlée par analyse en cytométrie de flux avec un anticorps anti-CD34 (Becton Dickinson).

II.6. Immunofluorescence

L'immunofluorescence est réalisée sur des lames de cyto-centrifugation congelées. Après décongélation, les cellules sont fixées en paraformaldéhyde (Sigma) à 4% dans du PBS 1X pendant 10 min, puis rincées 3 fois dans du PBS 1X et mises dans du lait à 5% dans du PBS (solution A) pendant 30 min.

Pour le marquage de la protéine Akt phosphorylée, les cellules sont mises en contact avec l'anticorps primaire anti phospho-Akt (Ser 473, Cell signaling, lot 9277) spécifique pour l'immunofluorescence dilué au 1/100 en solution A quatre heures minimum à température ambiante, rincées 3 fois 10 min en solution A, et marquées avec l'anticorps secondaire Texa Red anti lapin dilué au 1/500 en solution A pendant 30 min à l'obscurité. Les cellules sont enfin rincées 3 fois en solution A, puis une fois en PBS. Pour le marquage au DAPI, on ajoute 100µl d'une solution de DAPI diluée au 1/250 en PBS 0.2%. La lame est ensuite mise à l'obscurité 5 min et lavée trois fois en solution A. On ajoute enfin une goutte de Moviol contenant du DABCO (10 mg/ml, Sigma D25-22). Les lames peuvent être ainsi conservées à 4°C à l'obscurité.

II.7. Analyse par cytométrie de flux

L'expression de phospho Akt, et CD34 a été déterminée par cytométrie de flux sur des échantillons frais ou congelés de moelle. Environ 3×10^5 cellules sont incubées pendant 15 minutes avec un anticorps anti CD34-PE (Becton Dickinson) ou un contrôle isotypique, puis

fixées en PBS avec 5.5% de formaldéhyde pendant 15 minutes. Elles sont centrifugées et lavées dans 4 ml de PBS, puis perméabilisées avec le reactif Intraprep 2 (Immunotech) pendant 5 minutes, et marquées avec un anticorps primaire anti-phospho Akt (cat number 9277, Cell signaling) ou un anticorps de lapin anti IgG humaine (cat number I9764, Sigma) pendant 30 minutes. Elles sont à nouveau lavées dans 4 ml de PBS et incubées pendant 30 minutes avec l'anticorps secondaire anti-lapin conjugué au FITC (F1262, Sigma). Enfin, les cellules marquées sont lavées dans 4 ml de PBS, resuspendues dans 0.5 ml de PBS et analysées sur le cytomètre de flux EPICS-XL (Beckman Coulter).

II.8. Tests fonctionnels

II.8.1. Test de prolifération par incorporation de thymidine tritiée

Les cellules blastiques obtenues à la sortie du Ficoll sont diluées à 10^5 /ml en milieu de culture (α MEM complété avec 5% SVF, 10 UI/ml Pénicilline, 10 μ g/ml Streptomycine) et cultivées pendant 24 heures à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂ en boîte 96 puits à fond plat, en triplicate (100 μ l/puits soit 10^4 cellules). Les conditions sont les suivantes : milieu seul, LY 294002 à 25 μ M, rapamycine à 50ng/ml, IC87114 à 10 μ M, et une association des deux composés précédents. A l'issue de ces 24 heures, les cellules sont incubées pendant 6 heures à 37°C avec 1 μ Ci de ³H thymidine. L'incorporation de ³H thymidine est comptée en nombre de coups par minute (cpm) sur un compteur Topcount (Packard).

II.8.2. Etude de l'apoptose par fixation d'annexine V-PE

Ce test repose sur la reconnaissance par l'annexine V des phosphatidylsérines transloquées du feuillet interne au feuillet externe de la membrane plasmique lors du phénomène apoptotique, en présence d'ions calcium. Les cellules sont cultivées à la concentration de 10^5 /ml pendant 24 heures en milieu de culture contenant 5 % de sérum, avec ou sans LY 294002 à 25 μ M, rapamycine à 50ng/ml, IC87114 à 10 μ M, et une association des deux composés précédents. Elles sont ensuite lavées en tampon calcique (10mM Hépes/NaOH pH 7.4, 140mM NaCl, 2.5mM CaCl₂) dans des tubes de cytométrie de flux, incubées pendant 30 min à température ambiante à l'abri de la lumière en présence d'un μ l d'annexine V marquée à la phycoérythrine (BD Biosciences, PharMingen) dans 99 μ l de tampon calcique. Le volume est finalement complété à 500 μ l avec du tampon calcique, et la

fluorescence est analysée par un cytomètre de flux de type XL (Coultronics, Beckman Coulter, Miami, Floride). Le pourcentage de cellules Annexine V positives, qui correspond au pourcentage de cellules apoptotiques, est déterminé sur 10 000 cellules de la population totale à 24 heures.

II.9. Test de clonogénicité en méthylcellulose

Les cellules CD 34+ sontensemencées à raison de 400 cellules /ml en milieu à base de méthylcellulose (40% méthylcellulose, 30% SVF, 1% Glutamine, 10^{-4} mol/l β -mercaptoéthanol, 1% BSA, 1% Pénicilliline/Streptavidine en milieu IMDM) supplémenté avec les différentes cytokines: 15ng/ml IL3, 20ng/ml SCF, 20 ng/ml G-CSF, 5 ng/ml GM-CSF, 2 U/ml Epo. Des inhibiteurs sont ensuite ajoutés dans le milieu dans les conditions suivantes : LY 294002 à 25 μ M, IC87114 à 10 μ M, et renouvelés tous les 3 jours. Le nombre de colonies est enfin apprécié par lecture au microscope inversé après 7 jours et 14 jours de culture à 37 °C.

RESULTATS

III.1 Activation constitutive de la voie PI3K dans les cellules blastiques de LAM

Les cellules étudiées sont des blastes issus de la moelle osseuse de patients atteints de LAMs, prélevées au diagnostic, avant tout traitement. Les blastes sont purifiés par Ficoll, et un compte est effectué après coloration au MGG sur lame de cyto-centrifugation.

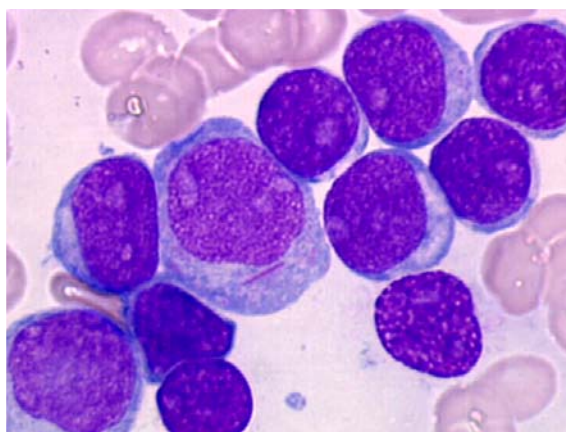
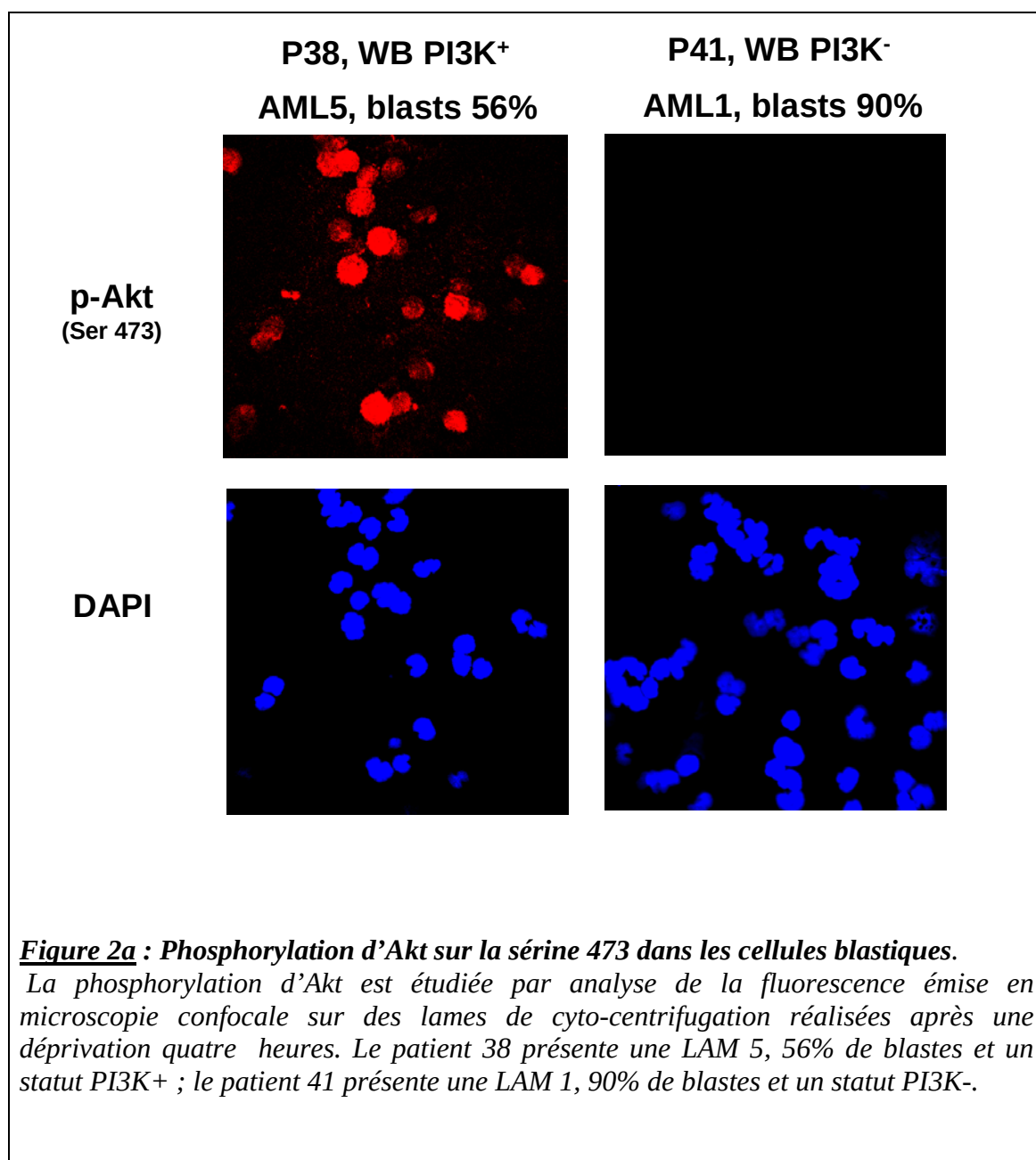


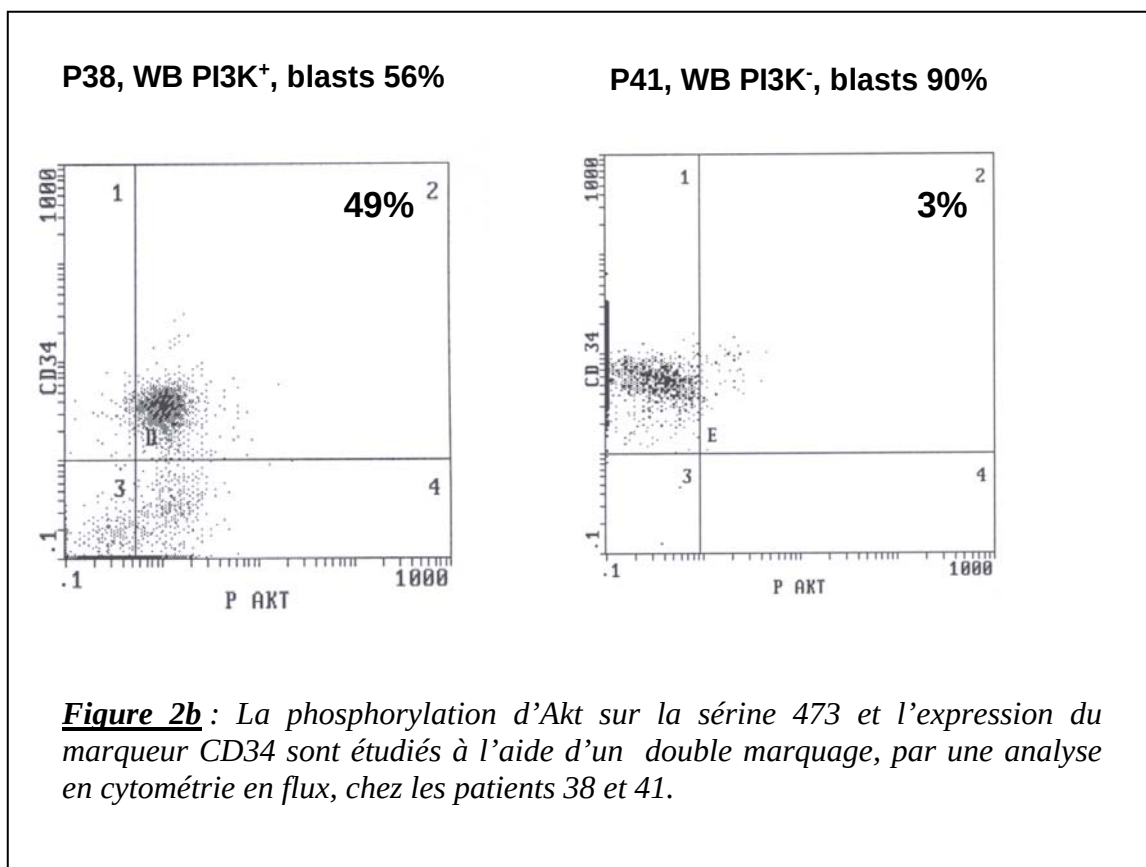
Figure 1 : Exemple de coloration au May-Grünwald-Giemsa d'une lame de cyto-centrifugation.

Après Ficoll, les cellules sont placées à 10^5 /ml en milieu de déprivation pendant quatre heures, puis étalées sur une lame par cyto-centrifugation (400rpm, 5 minutes) à raison de 20000 cellules par lame. Une coloration au May-Grünwald-Giemsa est ensuite réalisée et le pourcentage de cellules blastiques est évalué.

Le laboratoire ayant montré, par une étude biochimique, qu'il existait une activation constitutive de la voie PI3K dans environ 50% des LAM, j'ai voulu confirmer ce résultat par l'utilisation d'autres techniques. J'ai tout d'abord utilisé la technique d'immunomarquage des cellules avec un anticorps reconnaissant la forme phosphorylée d'Akt sur sérine 473, suivie de l'analyse en microscopie confocale de la fluorescence émise. Cette technique permet en outre d'affirmer que la protéine Akt phosphorylée est présente dans les cellules blastiques elles-mêmes et non dans les cellules hématopoïétiques normales résiduelles, d'après leur aspect

cytologique particulier et le pourcentage élevé de blastes sur la plupart des lames. Cette technique est effectuée sur des lames de cyto-centrifugation réalisées après une déprivation de deux heures comme pour l'étude biochimique, et permet de distinguer les patients ayant une voie PI3K constitutivement activée, comme le patient 38, et les patients PI3K- (patient 41), chez lesquels aucun signal n'est détecté (figure2a). Cette approche confirme les résultats de l'étude biochimique, avec une concordance de 80% (12/15) entre les deux techniques. J'ai ensuite réalisé une analyse de cytométrie en flux, par double marquage, à l'aide d'anticorps anti-CD34 et Akt anti-Ser 473 pour confirmer les résultats de la microscopie confocale (figure2b). Cette technique permet d'observer que la plupart des cellules positives pour la phosphorylation d'Akt appartiennent à la population de cellules leucémiques CD34+, à l'image du patient 38. De plus, ce type d'analyse est applicable aux patients ayant un pourcentage de blastes faible après purification.





En utilisant, les différentes approches décrites précédemment, nous avons mis en évidence une activation constitutive de la voie PI3K dans 58% des LAM étudiées (37/64). Aucune différence dans le pourcentage d'activation de la voie PI3K n'est observé entre les LAM *de novo* (31/54) et secondaire (6/10). Enfin, l'activation de la voie PI3K est présente de manière équivalente parmi les différents sous groupes de LAM, classés suivant la classification FAB (tableau 1).

FAB	PI3K⁺/total
M0	3/8
M1	3/10
M2	14/21
M4	6/10
M4_{eo}	2/2
M5	9/11
ND	0/2

Table 1 : Distribution des patients PI3K⁺ parmi les 64 patients étudiés en fonction de leurs sous-types FAB de LAM. ND : non déterminé.

III.2 La sous unité p110 δ est la seule constamment exprimée dans les cellules blastiques

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'activation des PI3K, j'ai étudié l'expression des trois isoformes α , β , et δ de la sous unité p110 dans les cellules leucémiques. Toutes les analyses suivantes réalisées en immunoempreinte sont effectuées sur les prélèvements contenant plus de 65 % de blastes après ficoll. Les cellules blastiques sont lysées dans du lammli 1X et l'analyse des différentes isoformes α , β , et δ de la p110 a été faite à l'aide d'anticorps spécifiques de chaque isoforme. Le témoin positif est représenté, pour chaque anticorps, par des protéines recombinantes de chaque isoforme.

La figure 1 montre cette expression chez 7 patients PI3K⁺ représentatifs et chez un patient PI3K⁻. On constate que seule la p110 δ est constamment exprimée alors que les p110 α et β le sont inconstamment. Ainsi, chez quelques patients, (patients 51 et 29), la seule isoforme détectable est la p110 δ . L'analyse de l'expression des différentes isoformes montre des résultats identiques, quelque soit le statut d'activation PI3K observé.

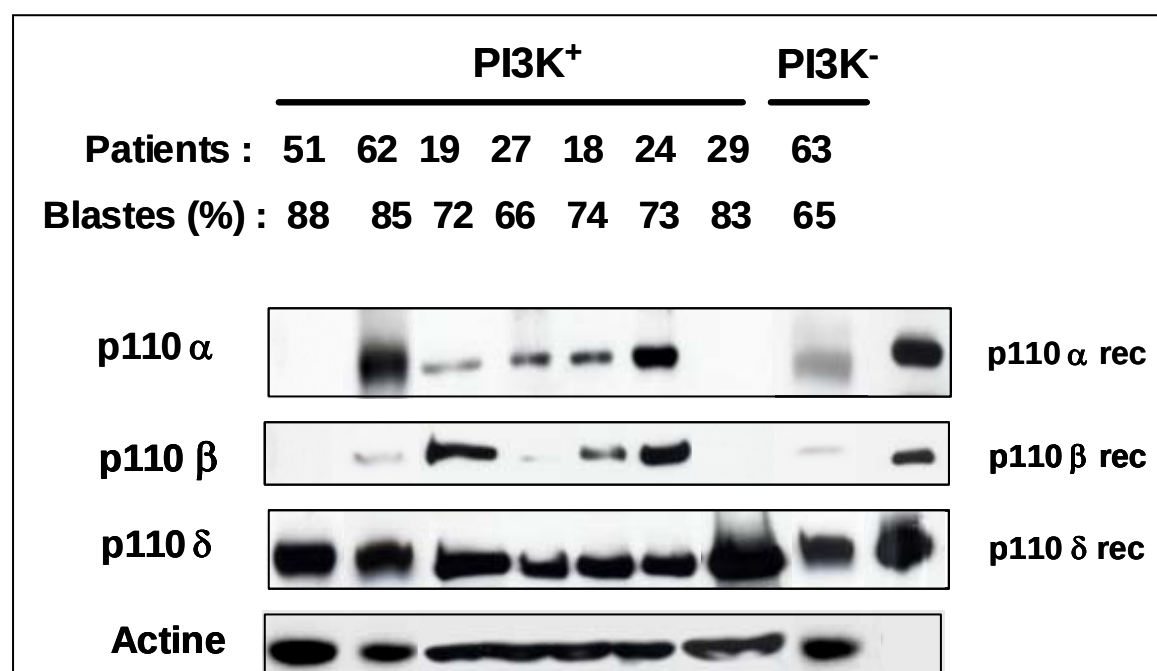


Figure 1 : La p110 δ est constamment exprimée chez les patients PI3K⁺ et PI3K⁻.

L'expression des différentes isoformes p110 α , p110 β et p110 δ de la PI3K de classe IA est analysée par immunoempreinte chez 7 patients PI3K⁺ et un patient PI3K⁻ représentatifs, à l'aide d'anticorps spécifiques d'isoforme. Les contrôles utilisés pour les isoformes p110 α , p110 β et p110 δ sont les protéines recombinantes de p110 α , p110 β et p110 δ respectives. Les dépôts correspondent à 10⁶ cellules blastiques. La quantification des patients est faite après immunoempreinte anti-actine.

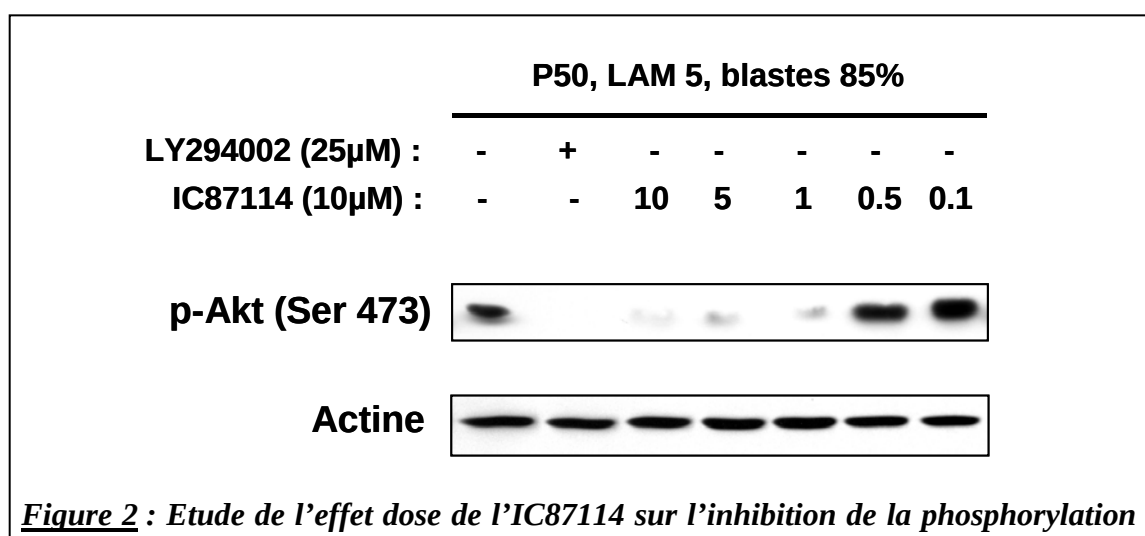
Ces résultats suggèrent que la p110 δ pourrait jouer un rôle essentiel dans l'activation constitutive de la PI3K observée dans les LAMs.

III.3 L'IC 87114, inhibiteur spécifique de la p110 δ , inhibe la prolifération des cellules blastiques PI3K+ mais n'a pas d'effet sur leur survie

Depuis peu, des inhibiteurs ayant une action sélective sur la p110 δ ont été développés. J'ai testé l'effet d'un tel inhibiteur, l'IC87114 (ICOS Corporation), sur la prolifération et la survie des cellules blastiques. *In vitro*, la spécificité de l'IC87114 pour la p110 δ est observée entre 1 μ M et 10 μ M (Sadhu et al., 2003b). A ces concentrations, l'IC87114 inhibe aussi la p110 γ mais n'a pas d'effet sur d'autres kinases (telles que p38 MAPK, DNA-PK, PKC α , PKC β).

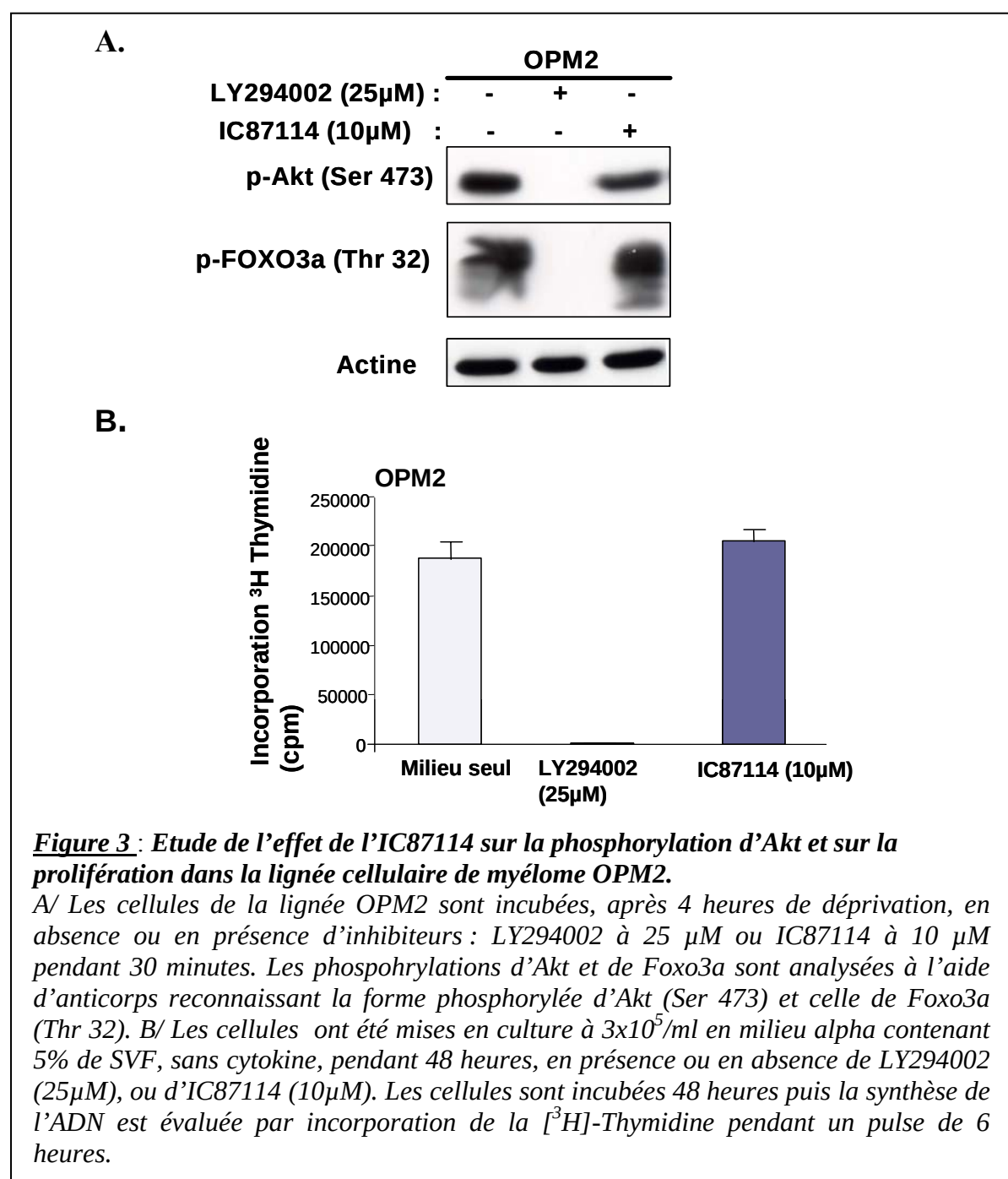
III.3.1 L'IC87114 inhibe complètement la phosphorylation d'Akt dans les blastes PI3K+.

J'ai d'abord déterminé à quelle concentration l'IC 87114 inhibe la phosphorylation d'Akt, dans les cellules blastiques de patients PI3K+. La figure 2 montre que l'IC 87114 inhibe la phosphorylation d'Akt (Ser 473) de façon dose dépendante, quand il est utilisé à des concentrations croissantes allant de 0.1 μ M à 10 μ M. Chez le patient 50 ayant une LAM 5 avec 85 % de blastes et une activation constitutive de la PI3K, l'inhibition maximale, identique à celle obtenue avec le LY294002 à 25 μ M, est obtenue avec l'IC87114 à 10 μ M et reste importante jusqu'à 1 μ M. Ces résultats ont été obtenus chez 2 patients.



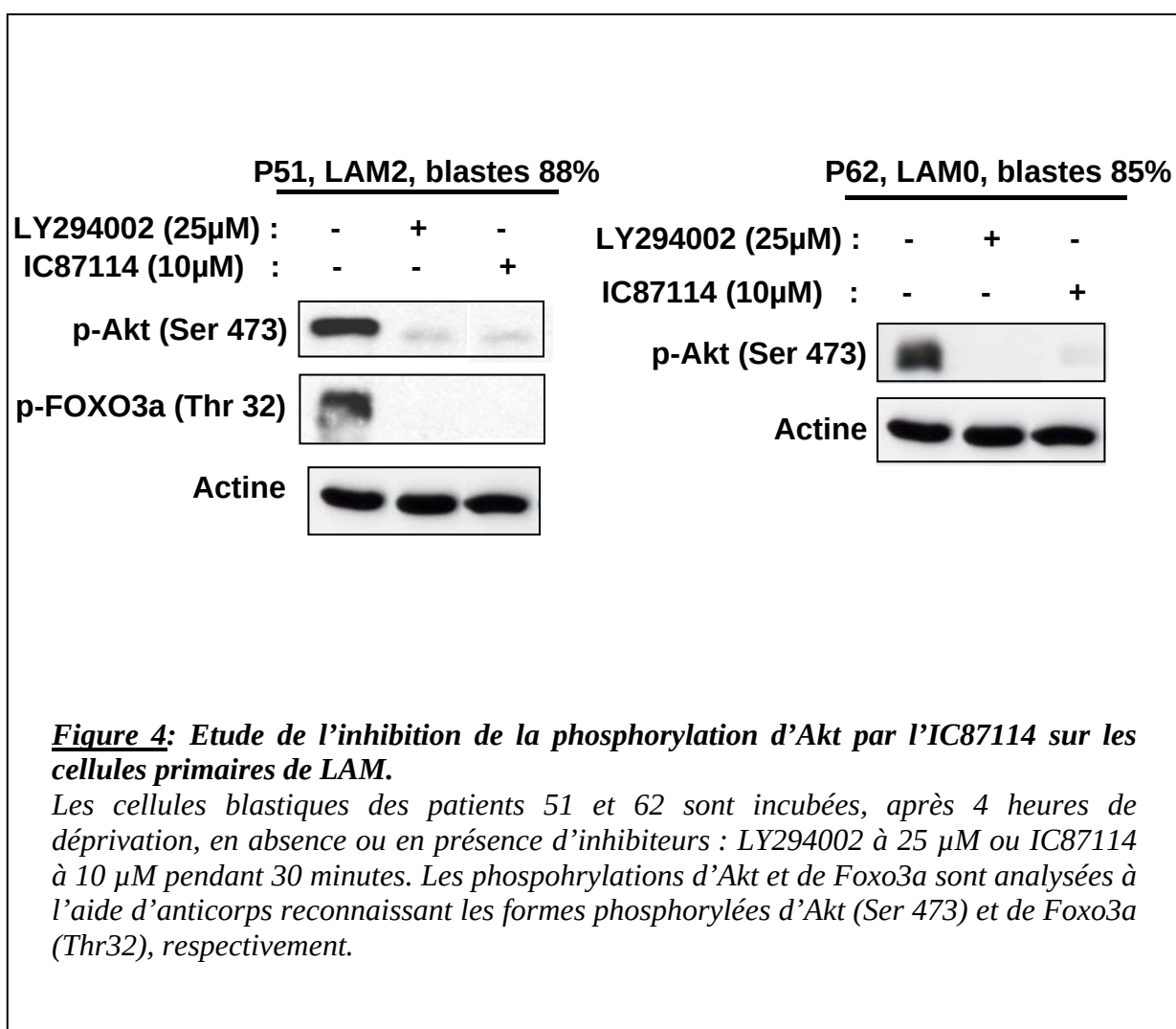
La spécificité de l'IC87114 pour la p110 δ a été confirmée par les résultats obtenus dans la lignée cellulaire humaine de myélome, OPM2, qui présente une activation PI3K constitutive due à une délétion du gène codant pour *PTEN*. OPM2 exprime les isoformes p110 α et β mais n'exprime pas la p110 δ . Dans cette lignée, l'IC87114 ne supprime pas la phosphorylation d'Akt ni de Foxo3a (figure 3A), et n'inhibe pas la prolifération cellulaire à 10 μ M (figure 3B).

J'ai donc utilisé dans les expériences suivantes l'IC 87114 à 10 μ M chez 7 patients PI3K+ pour inhiber l'activité PI3K.



La figure 4 montre deux patients PI3K+ représentatifs chez lesquels l'IC87114 supprime la phosphorylation d'Akt sur la sérine 473, de façon similaire au LY294002. Le patient 51 exprime uniquement l'isoforme δ de la p110 alors que le patient 62 exprime les 3 isoformes (figure 2). Ainsi chez les patients chez lesquels l'expression des isoformes p110 α et β est indétectable, l'activité PI3K observée pourrait s'exercer totalement par l'intermédiaire de la sous unité p110 δ .

Pour confirmer l'effet inhibiteur de l'IC87114 sur la voie PI3K/Akt, le statut de phosphorylation du facteur de transcription FOXO 3a sur la thréonine 32 a été étudié dans les mêmes conditions que précédemment. Comme attendu, cette phosphorylation est complètement réversible, chez le patient 51, avec un traitement par l'IC87114 (figure 4).



III.3.2 L'IC 87114 inhibe la prolifération des cellules blastiques.

La voie PI3K contrôle la prolifération cellulaire: les blastes PI3K+ ont une prolifération spontanée supérieure aux blastes PI3K-. J'ai donc réalisé des tests d'incorporation de thymidine tritiée sur les blastes de LAMs. Les cellules sont placées 24h en milieu contenant 5% de sérum, avec ou sans inhibiteurs. Différents inhibiteurs ont ainsi été testés : le LY294002 à 25 μ M, l'IC87114 à 10 μ M, la rapamycine, inhibiteur spécifique de mTOR, et l'association rapamycine + IC87114.

La figure 5 indique que l'IC 87114, à 10 μ M, inhibe la prolifération de cellules leucémiques des 2 patients 51 et 62 d'environ 70 %. Des résultats identiques ont été obtenus pour six patients PI3K+.

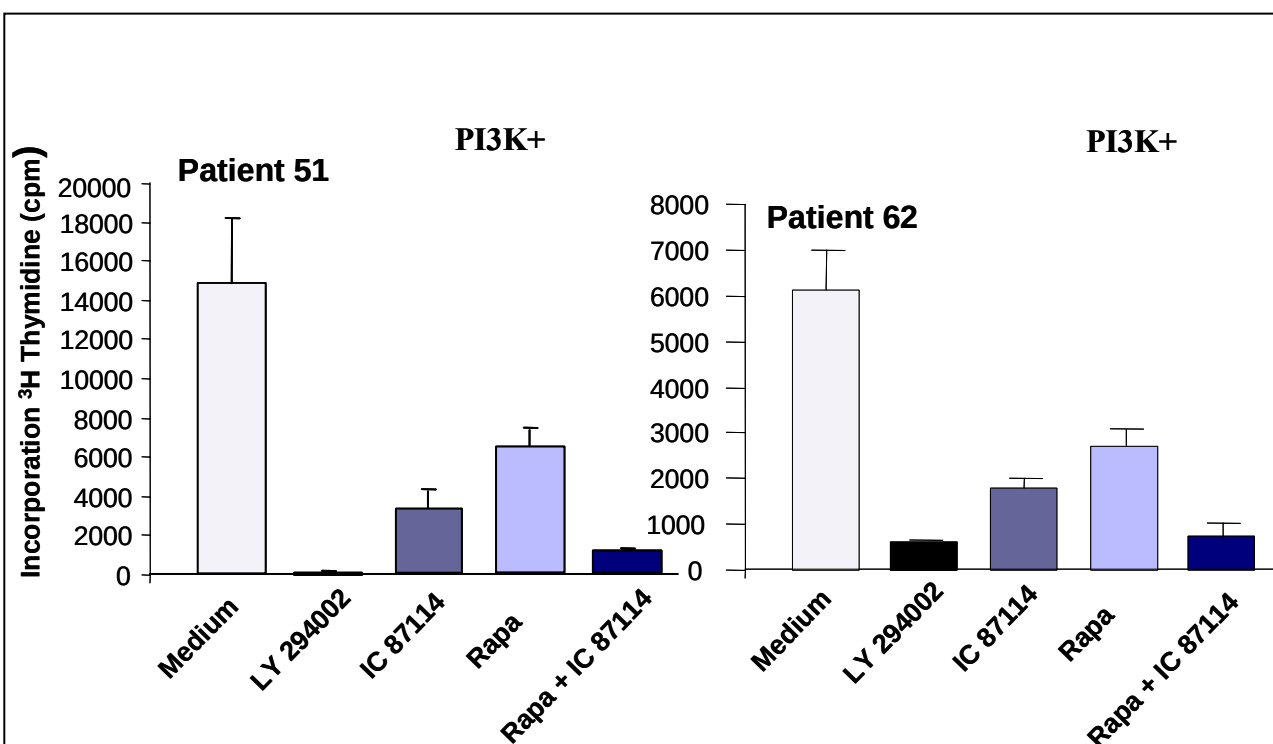
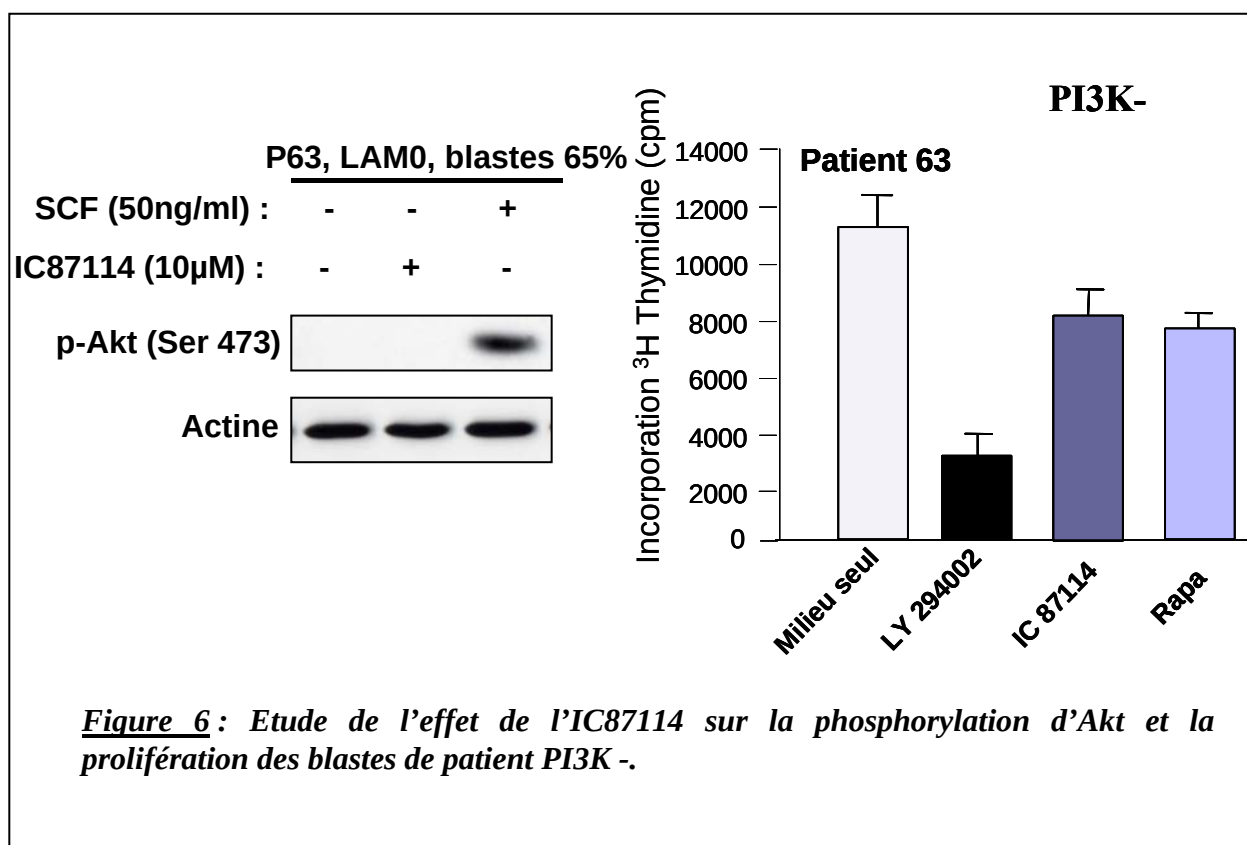


Figure 5 : Etude de l'effet de l'IC87114 sur la prolifération des cellules blastiques PI3K+.

Les cellules blastiques des patients 51 et 62 ont été mises en culture à $3 \times 10^5/\text{ml}$ en milieu alpha contenant 5% de SVF, sans cytokine, pendant 48 heures, en présence ou en absence de LY294002 (25 μ M), d'IC87114 (10 μ M), de rapamycine (50ng/ml) ou d'une association IC87114 + rapamycine aux mêmes concentrations que précédemment. Les cellules sont incubées 48 heures puis la synthèse de l'ADN est évaluée par incorporation de la [^3H]-Thymidine pendant un pulse de 6 heures.

En revanche, la prolifération des blastes PI3K- n'est pas significativement inhibée par l'IC87114. Des résultats similaires ont été obtenus pour cinq patients. Ainsi, les cellules leucémiques provenant du patient 63 expriment les 3 isoformes α , β , δ de la p110 (figure 2) mais ne présentent pas de phosphorylation constitutive d'Akt (figure 6). Leur prolifération est faiblement inhibée par l'IC87114 (25% d'inhibition). Je me suis assurée de l'induction de la phosphorylation d'Akt en stimulant les blastes avec du SCF à 50 ng/ml, dont le récepteur est exprimé par les cellules blastiques.

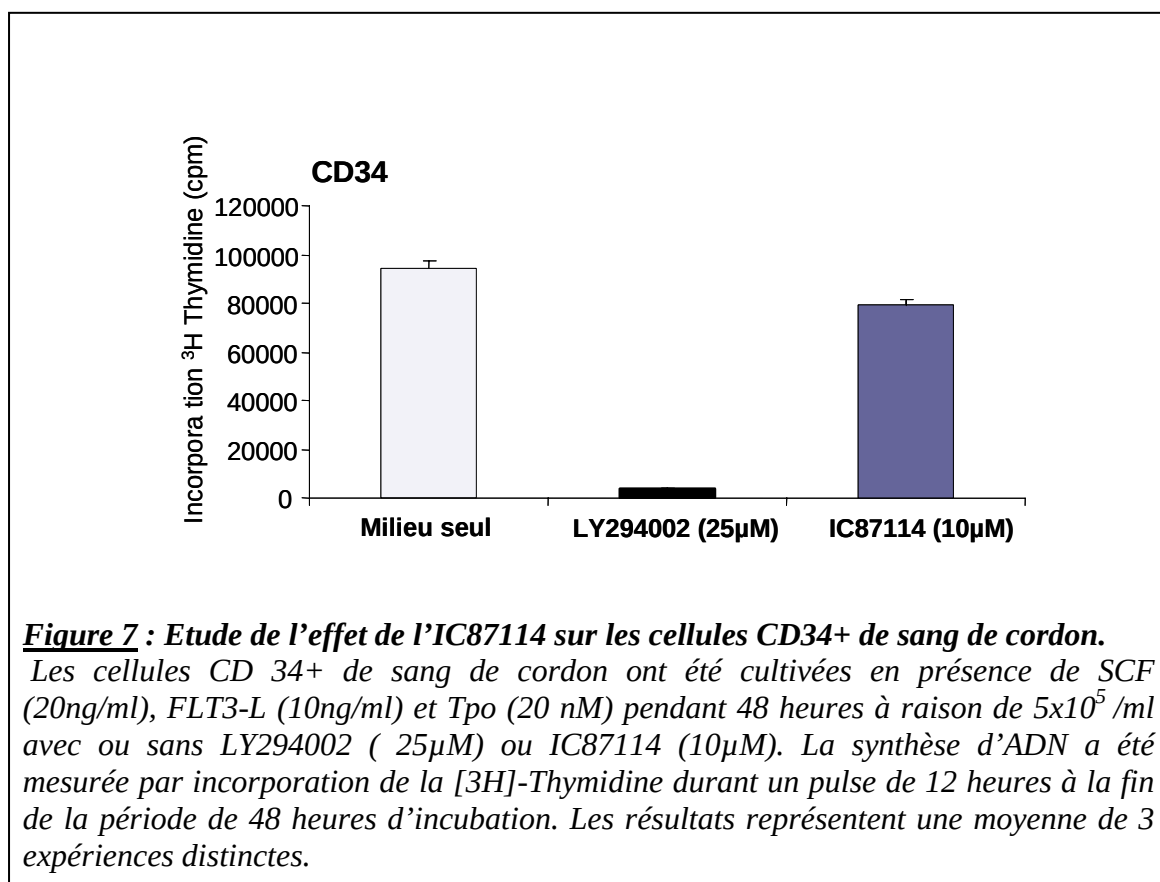
Par ailleurs, la figure 5 montre que la rapamycine inhibe la croissance des cellules de ces 2 patients PI3K+ (64% d'inhibition). De plus, on observe un effet additif sur l'inhibition de la prolifération, lorsqu'on supprime de façon concomitante l'activité de la voie PI3K/Akt par l'IC87114 et de la voie mTOR par la rapamycine. En revanche, l'effet de la rapamycine sur la prolifération du patient 63, PI3K-, est modéré (29% d'inhibition, figure 6).



III.3.3 L'IC 87114 ne modifie pas la prolifération des progéniteurs CD34+ normaux.

Les cellules CD34+ issus de 3 sangs placentaires ont été isolées par tri positif. Les cellules CD34+ expriment l'isoforme p110 δ . La prolifération des ces cellules CD34+

normales en présence de SCF, TPO et FL n'est pas modifiée par l'IC87114, alors que le LY 294002 bloque complètement cette prolifération (figure 7).



De plus, l'IC87114, utilisé à 10 µM, n'inhibe pas la formation des colonies myéloïdes (CFU-GM), ni des colonies érythroïdes (BFU-E, CFU-E) issues des cellules CD34+ de sang placentaire en test de clonogénicité en méthylcellulose, alors que le LY 294002 induit une inhibition de 95% des CFU-GM et des BFU-E.

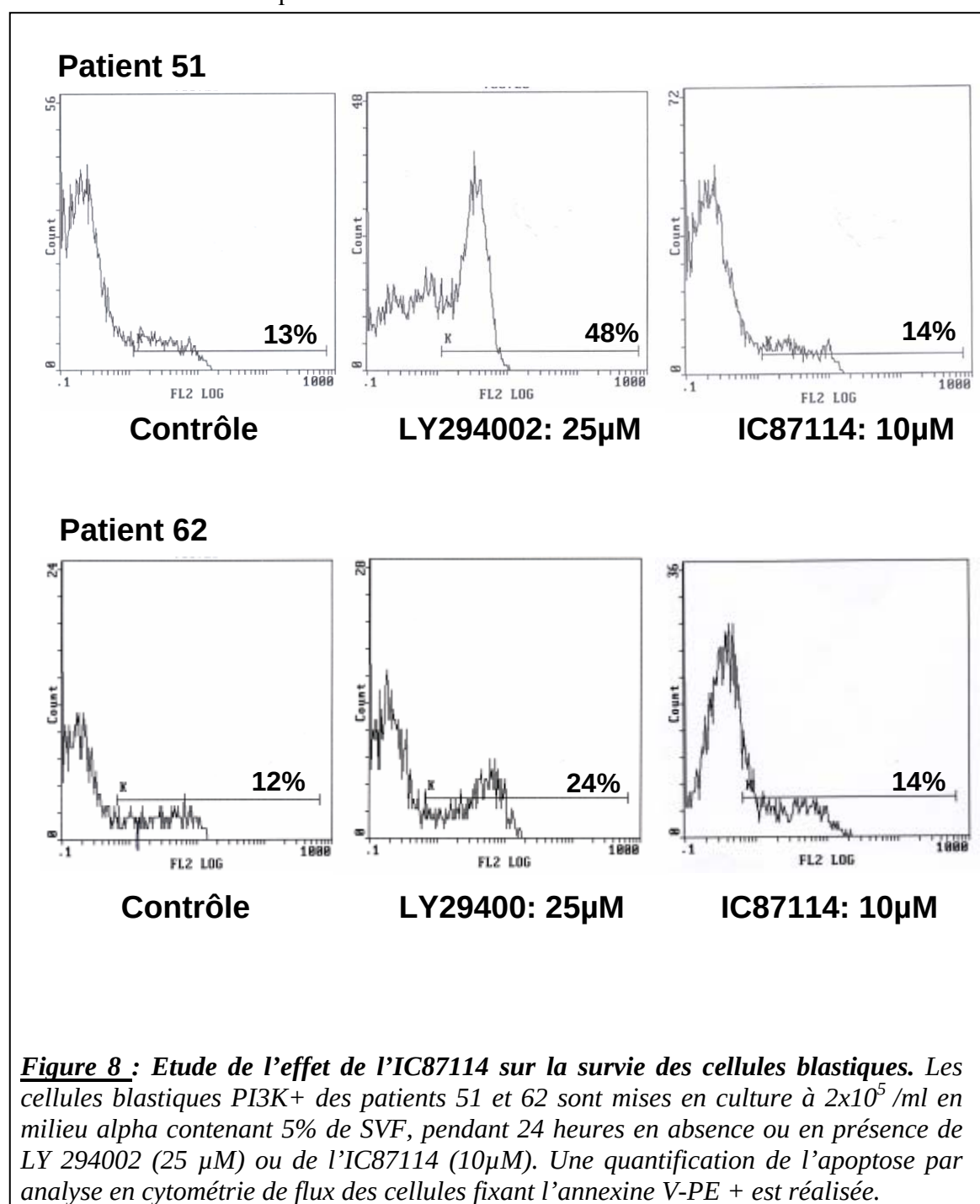
Ainsi, la faible toxicité de l'IC87114 sur les progéniteurs hématopoïétiques normaux, contrairement à l'inhibition drastique induite par le LY294002, pourrait permettre son utilisation en clinique avec un bon index thérapeutique.

III.3.4 L'IC 87114 n'a pas d'effet sur la survie des cellules blastiques PI3K+.

L'activation de la voie PI3K/Akt pourrait favoriser la survie des cellules blastiques. J'ai donc étudié la survie des blastes de LAMs en situation spontanée et en situation

d'inhibition de la voie PI3K par le LY 294002 ou par l'IC87114. L'apoptose est quantifiée par marquage des cellules à l'annexine V-PE.

La figure 8 montre les résultats obtenus chez les patients PI3K+ 51 et 62 déjà présentés (figure 5). On observe que le LY294002 à 25 μ M induit l'apoptose des cellules blastiques [13% en milieu seul, 48% en LY294002 pour le patient 51 ; 12% en milieu seul, 24% en LY294002 pour le patient 62]. Dans les mêmes conditions, on remarque que l'IC87114 n'induit pas l'apoptose. Des résultats similaires ont été observés chez dix patients. De la même façon, la rapamycine seule ou en association avec l'IC87114 n'influe pas sur la survie des cellules blastiques.



Ainsi, j'ai montré dans cette première partie de DEA, que:

- 1- la sous unité p110 δ est la seule constamment exprimée dans les cellules blastiques.
- 2- l'IC87114, un inhibiteur spécifique de la p110 δ inhibe la prolifération des cellules blastiques ayant une activation de la voie PI3K, en supprimant complètement la phosphorylation d'Akt.
- 3- l'IC87114 ne modifie pas la prolifération des progéniteurs CD34+ normaux.
- 4- l'IC87114 n'a pas d'effet sur la survie des cellules blastiques.

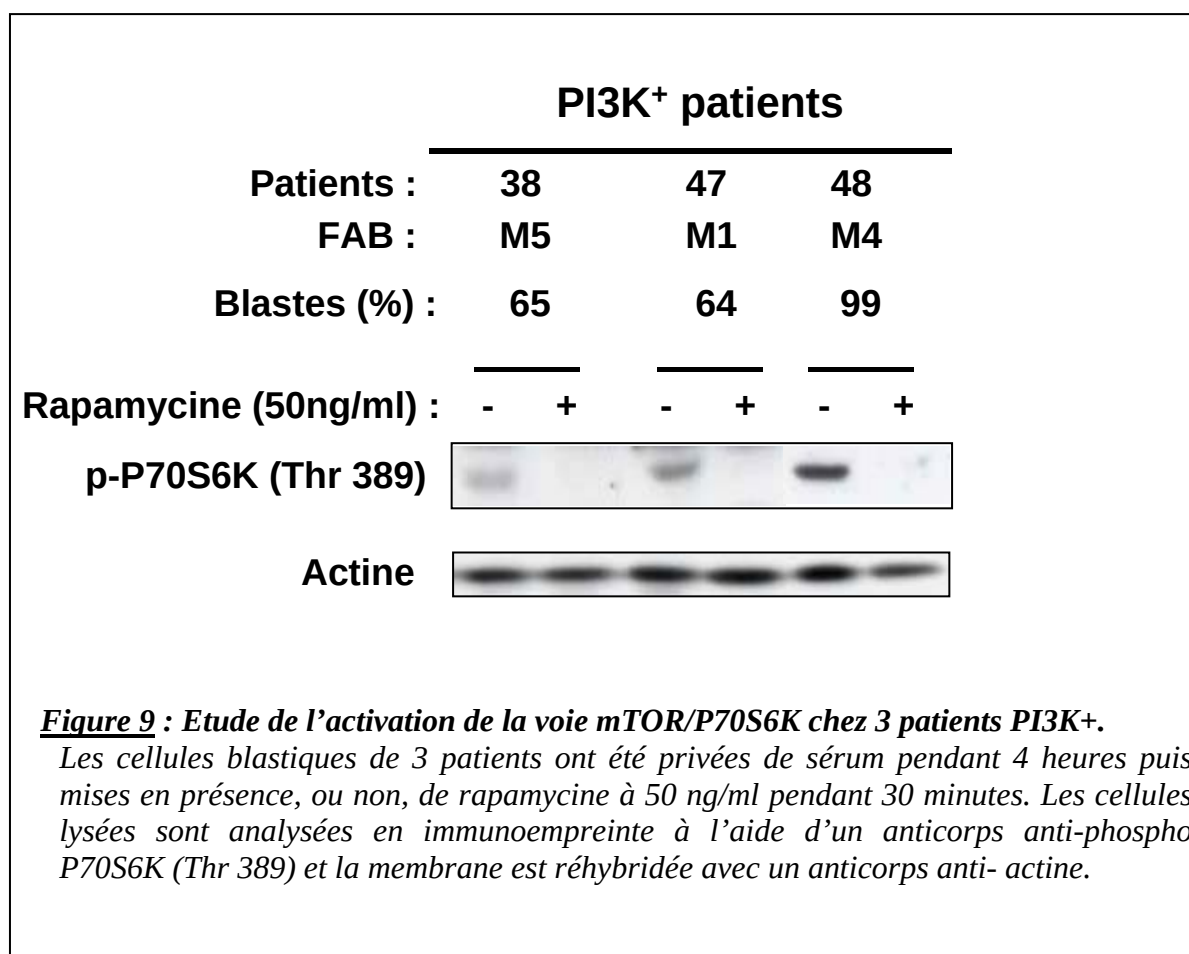
Ainsi, l'inhibition de la voie de signalisation PI3K/Akt dans les LAMs présentant une activation constitutive de cette voie PI3K, semble être une approche prometteuse dans le cadre d'une thérapeutique ciblée. L' IC87114 pourrait présenter un bon index thérapeutique en clinique, étant donné sa faible toxicité sur les progéniteurs hématopoïétiques normaux. Cependant, il serait intéressant de tester l'IC87114 en association avec la chimiothérapie dans le but de sensibiliser les cellules blastiques à l'apoptose induite par ces drogues.

III.4 La voie mTOR/P70S6K/4 E-BP1

J'ai observé qu'il existe un effet additif de l'association IC87114 + rapamycine sur l'inhibition de la prolifération des blastes. Je me suis donc intéressée à l'activation de la voie mTOR/P70S6K/4E-BP1, dont on sait qu'elle est activée en aval de la voie PI3K/Akt dans de nombreux modèles cellulaires.

La voie mTOR/P70S6K/4E-BP1 est activée indépendamment de la voie PI3K/Akt dans les LAMs

Dans un premier temps, afin de déterminer si la voie mTOR est activée dans les cellules blastiques de LAMs, comme le suggère l'effet de son inhibition par la rapamycine, j'ai étudié le statut de phosphorylation de la protéine P70S6K, l'un des substrats de mTOR, sur la thréonine 389.



La figure 9 montre l'étude biochimique réalisée chez 3 patients PI3K⁺, chez lesquels on observe une phosphorylation de P70S6K en situation de déprivation. La spécificité de la phosphorylation de P70S6K par la voie mTOR est vérifiée en montrant que cette phosphorylation disparaît quand les cellules blastiques sont traitées 30 minutes avec 50ng/ml de rapamycine.

Néanmoins, étant donné la très faible sensibilité de cet anticorps dans les cellules blastiques, j'ai développé les outils suivants pour étudier l'activation de la voie mTOR :

- Etude de la phosphorylation de P70S6K par analyse du retard à la migration électrophorétique.
- Etude du statut de phosphorylation de 4 E-BP1, à l'aide d'un anticorps dirigé contre la forme phosphorylée de 4 E-BP1 sur la sérine 65, ou par analyse du retard à la migration électrophorétique.

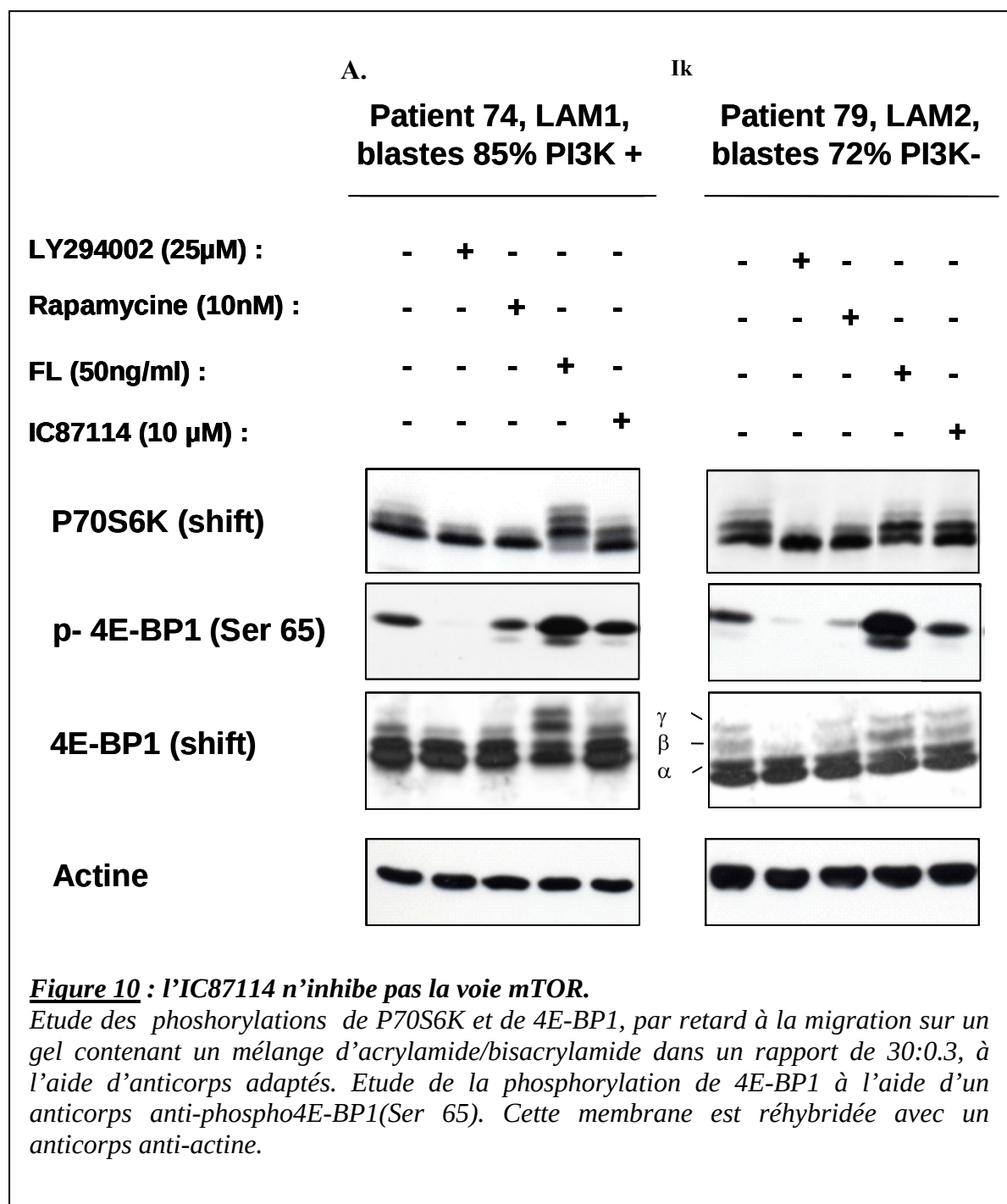
J'ai donc étudié le statut d'activation de la voie mTOR en utilisant ces techniques chez dix patients (5 patients PI3K⁺ et 5 patients PI3K⁻). La figure 10A est représentative des résultats obtenus chez les patients PI3K⁺. On constate chez le patient 74, ayant une activation

constitutive d'Akt, qu'il existe également une activation de mTOR, comme l'indique la phosphorylation des protéines p70S6K et 4E-BP1. Le retard de migration électrophorétique de la protéine P70S6K, inhibé par le LY294002 et la rapamycine témoigne de son état de phosphorylation. La phosphorylation de la protéine 4E-BP1 est affirmée par la mise en évidence de sa phosphorylation spécifique sur la sérine 65 et par la présence de toutes les formes de 4E-BP1 :

- la forme hypophosphorylée (α), qui se présente sous la forme d'un doublet.
- La forme intermédiaire (β)
- La forme hyperphosphorylée (γ).

La phosphorylation de 4E-BP1 sur la sérine 65 est inhibée par le LY 294002 à 25 μ M, et partiellement inhibée par la rapamycine. Le LY294002 et la rapamycine diminuent l'expression de la forme hyperphosphorylée γ de 4E-BP1 et augmentent l'expression de la forme α hypophosphorylée. La rapamycine inhibe donc la liaison de eIF4E au complexe eIF4F et bloque l'initiation de la traduction.

Surtout, chez les patients PI3K+ étudiés (comme le patient 74 présenté dans la figure 10A), on constate que l'IC87114, qui inhibe complètement la phosphorylation d'Akt et donc toute l'activité PI3K observée, n'a aucun effet sur l'état de phosphorylation des protéines P70S6K et 4E-BP1. Ces résultats indiquent clairement que l'activation de mTOR est indépendante de l'activation PI3K. Ceci est renforcé par le fait que j'ai pu identifier une activation constitutive de mTOR chez 2 patients PI3K- (sur les 5 patients testés). Ainsi, la figure 10B illustre ce résultat, authentifié par la mise en évidence d'une phosphorylation de P70S6K et 4E-BP1 chez le patient 79, PI3K-. Là encore, et comme attendu, l'IC87114 n'a pas d'effet sur l'état de phosphorylation des cibles de mTOR.



On peut donc affirmer qu'il existe, indépendamment de l'activation constitutive de la voie PI3K/Akt, une activation de la voie mTOR non contrôlée par Akt, dans les blastes de LAMs.

IV.

DISCUSSION

Le laboratoire ayant précédemment montré, par analyse en immunoempreinte de la phosphorylation d'Akt (Ser 473) et de FOXO3a (Thr 32), qu'il existait une activation constitutive de la voie PI3K/Akt dans environ 50 % des cas de LAMs, nous avons voulu confirmer ce résultat en utilisant deux approches techniques différentes : une étude d'immunofluorescence sur lame de cyto-centrifugation permettant de mettre en évidence cette phosphorylation dans les cellules blastiques elles-mêmes, et une analyse de la phosphorylation d'Akt dans les blastes CD34+ en cytométrie de flux. De plus, cette dernière technique pourra s'appliquer au patient ayant un pourcentage de cellules blastiques faible. Nous pouvons ainsi affirmer la présence d'une activation constitutive de la voie PI3K/Akt chez 36/64 (58%) des échantillons de LAM testés. Récemment, Xu *et al.* ont également décrit une activation constitutive de la voie PI3K dans les LAM, mais avec une fréquence plus élevée (90%) que la notre. Il existe une raison méthodologique pouvant expliquer cette différence d'incidence entre nos deux études (90% contre 58%). En effet, j'ai réalisé cette étude de signalisation sur des cellules blastiques fraîches (immédiatement après le prélèvement), et après une courte période de déprivation, alors que Xu *et al.* travaillent sur des cellules congelées et lysées immédiatement après décongélation sans respecter un temps de déprivation. Cependant, s'ils réalisent une incubation de leurs cellules en milieu sans sérum privé de cytokines, ils observent une diminution de la phosphorylation d'Akt dans 50% des cas, indiquant que l'activation constitutive de la PI3K est présente chez environ 40% de leurs patients (58% dans notre étude).

Etant donné la présence d'une activation constitutive de la voie PI3K/Akt dans environ 50 % des cas de LAMs, nous avons voulu comprendre les mécanismes d'activation de cette voie et son implication dans la biologie des LAMs. Le LY294002 inhibe la prolifération des cellules blastiques et induit leur apoptose. Cet effet est observé préférentiellement chez les patients ayant une activité PI3K constitutive, mais également à un moindre degré, chez les patients PI3K-. Le LY294002 n'est pas un inhibiteur spécifique des PI3K: il bloque également l'activité catalytique d'autres kinases telles que DNA-PK, mTOR et ATM/Atr. De plus, toutes les PI3K sont inhibées par le LY294002, indépendamment de leur classe et des isoformes α , β , ou δ des PI3K de classe Ia. Ainsi, afin de mieux comprendre l'activation des PI3K, j'ai étudié l'expression des trois isoformes α , β , et δ de la sous unité p110 dans les cellules leucémiques. A l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre les sous unités p110 α , p110 β et

p110 δ , j'ai pu montré que seule la p110 δ est constamment exprimée dans les cellules blastiques, indépendamment de l'activité PI3K constitutive. Contrairement à la p110 α et à la p110 β qui présentent une expression ubiquitaire, la p110 δ ne semble être présente que dans les leucocytes, quelque soit leur stade de différenciation (Vanhaesebroeck et al., 1997), aussi bien dans les cellules myéloïdes que dans les cellules lymphoïdes. La signalisation du récepteur à l'antigène dans les cellules B et T est abolie chez les souris exprimant une forme inactive de la p110 δ (Okkenhaug et al., 2002). Récemment, il a été démontré que la p110 δ joue un rôle important dans le chimiotactisme des neutrophiles (Sadhu et al., 2003a), notamment durant la réaction inflammatoire (Puri et al., 2004). Une implication de la p110 δ a été récemment décrite dans les cancers du sein. L'inhibition sélective de l'activité kinase de la p110 δ par un inhibiteur spécifique bloque la migration cellulaire (Sawyer et al., 2003). L'IC87114 (ICOS coporation) est un inhibiteur sélectif de la p110 δ lorsqu'il est utilisé à des concentrations allant de 0.3-10 μ M. En effet, les concentrations inhibitrices moyennes de l'IC87114 pour les p110 α et p110 β sont 100 fois plus élevées (Sadhu et al., 2003b). J'ai montré que le traitement des cellules blastiques par l'IC87114 utilisé à 10 μ M supprime complètement l'activation de la voie PI3K, jugée par la phosphorylation d'Akt sur la sérine 473, dans tous les échantillons PI3K+ que j'ai pu tester. Cet effet est similaire à celui observé avec le LY294002 à 25 μ M. La phosphorylation d'Akt est presque inexistante pour des concentrations comprises entre 10 et 1 μ M. Cependant, à ces concentrations l'IC87114 est capable d'inhiber également l'activité kinase de la p110 γ , isoforme de classe Ib de la PI3K activée en aval des récepteurs couplés aux protéines G. L'étude de l'expression de cette isoforme dans les cellules blastiques est en cours pour, éventuellement, exclure toute activation de la PI3K dépendante de la p110 γ .

L'inhibition de l'activité PI3K obtenue grâce à l'IC87114 dans les blastes PI3K+ montre l'importance de l'isoforme p110 δ des PI3K de classe Ia dans le contrôle de la prolifération des cellules blastiques. Une inhibition de 70% de la prolifération est alors obtenue. Cependant, il existe un effet modéré sur la prolifération blastiques des patients PI3K- qui nuance la spécificité de l'inhibiteur. Chez les patients n'exprimant ni la p110 α ni la p110 β , toute l'activité PI3K observée pourrait dépendre exclusivement de l'expression de la p110 δ , comme c'est le cas notamment pour le patient 51 (figure2). Cependant, là encore, je ne peut pas exclure un rôle potentiel de la p110 γ . De même, l'absence d'implication des isoformes p110 α et p110 β ne peut être exclue et nécessiterait une exploration plus approfondie, notamment par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de ces isoformes ou encore

par la technique de SiRNA. Toutefois, l'hypothèse la plus probable est celle d'une expression préférentielle et majoritaire de l'isoforme δ de la p110 dans les cellules blastiques, cette isoforme étant exprimée normalement dans les cellules CD34+ au cours de la différenciation.

L'inhibition de la prolifération induite par l'IC87114 est du même ordre que celle induite par la rapamycine. Contrairement à ce qui a été décrit dans les modèles de tumeurs délétées de PTEN (Neshat et al., 2001), des résultats préliminaires indiquent que l'activation de la voie mTOR ne confère pas aux cellules leucémiques une hypersensibilité à la rapamycine. Surtout, j'ai observé que l'utilisation concomitante de ces deux inhibiteurs augmente leurs effets respectifs, chez tous les patients testés et quelque soit le statut d'activation de la voie PI3K. J'ai donc voulu aborder l'étude du mécanisme biochimique qui pourrait expliquer cet effet additif, suggérant que la voie mTOR pourrait être activée de manière indépendante de la voie PI3K. J'ai pu montrer qu'il existe une activation de la voie mTOR dans les cellules blastiques. En effet les phosphorylations des deux substrats de mTOR, que sont la protéine P70S6K et la protéine 4E-BP1, reflet de l'activation de la voie, ne sont pas inhibées par l'IC87114. De plus, une activation constitutive de la voie mTOR est observée dans les cellules blastiques de deux patients PI3K-. Ainsi, le contrôle de mTOR par Akt, largement décrit dans d'autres modèles, n'est pas retrouvé dans les LAMs PI3K+.

Mes résultats montrent que la voie mTOR est activée constitutivement, indépendamment de la voie PI3K. Des résultats récents que j'ai obtenus, semblent indiquer que la voie ERK/MAPK (activée dans 90% des LAMs) ne contrôle pas non plus l'activation de mTOR. En effet son inhibition par le U0126 (inhibiteur spécifique des MAPK) est sans effet sur la phosphorylation des différents substrats de mTOR.

Cette activation de mTOR suggère qu'il existe dans les cellules blastiques PI3K+ et PI3K- une activation du complexe de traduction eIF4F. Une telle activation continue de la machinerie traductionnelle, en aval de mTOR, a été récemment impliquée dans l'expansion clonale et la formation de tumeurs épithéliales mammaires (Avdulov et al., 2004). Une dérégulation de l'activité traductionnelle en aval de mTOR pourrait également être impliquée dans la biologie des LAMs. Pour mieux comprendre le mécanisme d'activation de mTOR dans les cellules blastiques, j'étudie actuellement l'expression de la protéine, suppresseur de tumeur, TSC2, son état de phosphorylation par Akt et l'expression de Rheb, dont la surexpression est oncogénique. Etant donné que l'état d'activation de Rheb sous forme GTP ne peut être détecté directement, en l'absence de substrat actuellement identifié, j'utilise des inhibiteurs de farnésyltransférase (FTI). En effet, la protéine Rheb a besoin d'être farnésylée

pour être active (Castro et al., 2003). Je déterminerai ainsi l'état d'activation des protéines P70S6K et 4E-BP1 en présence de FTI.

Enfin, des mécanismes potentiels couplant mTOR avec la signalisation métabolique ont été décrits. Il a été suggéré que mTOR pourrait fonctionner comme un senseur homéostatique au changement d'ATP intracellulaire. Il est possible que l'état d'activation de la voie mTOR résulte de l'activation d'une sérine/thréonine kinase, la protéine LKB1, suppresseur de tumeur (Shaw et al., 2004). LKB1 réprimerait la voie mTOR en activant la protéine kinase AMPK, dans certaines conditions de stress. AMPK agirait sur TSC2 pour lui permettre d'exercer son action inhibitrice sur la voie mTOR. Ainsi, on peut s'attendre à une activité de AMPK diminuée dans les cellules mTOR+. Nous pourrions donc tester cette activité par l'étude de la phosphorylation de son substrat, l'acétylCoA carboxylase (ACC).

J'ai montré que la sous unité p110 δ des PI3K et la kinase mTOR contrôlent la prolifération cellulaire, avec un effet additif lors de l'inhibition concomitante de ces deux voies. Cet effet s'explique par le fait qu'elles sont activées indépendamment l'une de l'autre. Cependant, aucune de ces deux voies ne contrôle la survie des cellules leucémiques. En effet, malgré une inhibition complète de la phosphorylation de FOXO3a, l'IC87114 n'induit pas l'apoptose des cellules blastiques. De même, la rapamycine ne modifie pas leur survie, alors qu'en inhibant directement l'activité de mTOR, elle devrait permettre la séquestration du facteur d'initiation eIF4E, décrit récemment comme un acteur majeur de la survie cellulaire (Li et al., 2002). Ainsi, l'apoptose induite par le LY294002 dans les cellules blastiques (Xu et al., 2003) (Zhao et al., 2004) ne dépend pas de sa capacité à inhiber la p110 δ , mais pourrait être corrélée à l'inhibition d'autres kinases telles que DNA-PK, ATM et/ou Atr.

Il paraît indispensable de restaurer une voie d'apoptose dans ces cellules blastiques pour envisager l'utilisation en clinique de thérapeutiques ciblées, comme l'IC87114 ou la rapamycine dont l'utilisation seule n'aura qu'un effet cytostatique. Il serait intéressant d'étudier l'effet de l'inhibition de la voie NF-kB, récemment impliquée dans le contrôle de la survie des cellules leucémiques (Guzman et al., 2001), en association à ces inhibiteurs. En outre, l'inhibition de la voie PI3K par l'IC87114 et de la voie mTOR par la rapamycine, pourrait sensibiliser les blastes à l'apoptose induite par des chimiothérapies utilisées dans le traitement des LAMs (daunorubicine, vépéside, aracytine). La question de la séquence d'administration de ces inhibiteurs, qui bloquent probablement les cellules leucémiques en phase G0/G1 du cycle cellulaire, par rapport à l'administration de chimiothérapies cycle-dépendantes, est importante. Il a été récemment montré qu'une administration simultanée ou

séquentielle d'une chimiothérapie et d'un inhibiteur de FLT3, le CEP701, présente de meilleurs résultats en matière d'induction d'apoptose (Levis et al., 2004).

Enfin, cette étude s'inscrit dans le protocole clinique (LAM2001 du GOELAMS) qui teste la valeur pronostique de l'activation constitutive de la voie PI3K et de la voie mTOR en terme de mise en rémission complète, de survie sans rechute, de survie globale.

Conclusion

Ainsi, la compréhension de plus en plus détaillée des mécanismes moléculaires de la leucémogénèse constitue une étape indispensable pour le développement de thérapeutiques ciblées. Mon étude montre que les voies PI3K/Akt et mTOR sont impliquées dans la leucémogénèse humaine et pourraient bientôt constituer des cibles thérapeutiques de choix pour le traitement des LAMs. En ce qui concerne la rapamycine, des études cliniques pilotes sont en cours.

V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1998). A systematic collaborative overview of randomized trials comparing idarubicin with daunorubicin (or other anthracyclines) as induction therapy for acute myeloid leukaemia. AML Collaborative Group. *Br J Haematol* 103, 100-109.

Alessi, D. R., Kozlowski, M. T., Weng, Q. P., Morrice, N., and Avruch, J. (1998). 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro. *Curr Biol* 8, 69-81.

Avdulov, S., Li, S., Van, M., Burrichter, D., Peterson, M., Perlman, D. M., Manivel, J. C., Sonenberg, N., Yee, D., Bitterman, P. B., and Polunovsky, V. A. (2004). Activation of translation complex eIF4F is essential for the genesis and maintenance of the malignant phenotype in human mammary epithelial cells. *Cancer Cell* 5, 553-563.

Benekli, M., Baer, M. R., Baumann, H., and Wetzler, M. (2003). Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood* 101, 2940-2954.

Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R., and Sultan, C. (1985). Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103, 620-625.

Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R., and Sultan, C. (1991). Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *Br J Haematol* 78, 325-329.

Bishop, J. F., Matthews, J. P., Young, G. A., Szer, J., Gillett, A., Joshua, D., Bradstock, K., Enno, A., Wolf, M. M., Fox, R., and et al. (1996). A randomized study of high-dose cytarabine in induction in acute myeloid leukemia. *Blood* 87, 1710-1717.

Bjornsti, M. A., and Houghton, P. J. (2004a). Lost in translation; Dysregulation of cap-dependent translation and cancer. *Cancer Cell* 5, 519-523.

Bjornsti, M. A., and Houghton, P. J. (2004b). The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4, 335-348.

Bouscary, D., Pene, F., Claessens, Y. E., Muller, O., Chretien, S., Fontenay-Roupie, M., Gisselbrecht, S., Mayeux, P., and Lacombe, C. (2003). Critical role for PI 3-kinase in the control of erythropoietin-induced erythroid progenitor proliferation. *Blood* 101, 3436-3443.

Brazil, D. P., Yang, Z. Z., and Hemmings, B. A. (2004). Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci* 29, 233-242.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., and Greenberg, M. E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.

- Cantley, L. C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655-1657
- Cantley, L. C., and Neel, B. G. (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4240-4245.
- Cassileth, P. A., Harrington, D. P., Appelbaum, F. R., Lazarus, H. M., Rowe, J. M., Paietta, E., Willman, C., Hurd, D. D., Bennett, J. M., Blume, K. G., *et al.* (1998). Chemotherapy compared with autologous or allogeneic bone marrow transplantation in the management of acute myeloid leukemia in first remission. *N Engl J Med* 339, 1649-1656.
- Castro, A. F., Rebhun, J. F., Clark, G. J., and Quilliam, L. A. (2003). Rheb binds tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) and promotes S6 kinase activation in a rapamycin- and farnesylation-dependent manner. *J Biol Chem* 278, 32493-32496.
- Cheson, B. D., Bennett, J. M., Kopecky, K. J., Buchner, T., Willman, C. L., Estey, E. H., Schiffer, C. A., Doehner, H., Tallman, M. S., Lister, T. A., *et al.* (2003). Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 21, 4642-4649.
- Dash, A., and Gilliland, D. G. (2001). Molecular genetics of acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 14, 49-64.
- Datta, S. R., Brunet, A., and Greenberg, M. E. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13, 2905-2927.
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M. E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.
- Drenan, R. M., Liu, X., Bertram, P. G., and Zheng, X. F. (2004). FKBP12-rapamycin-associated protein or mammalian target of rapamycin (FRAP/mTOR) localization in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *J Biol Chem* 279, 772-778.
- Druker, B. J., Sawyers, C. L., Kantarjian, H., Resta, D. J., Reese, S. F., Ford, J. M., Capdeville, R., and Talpaz, M. (2001). Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 344, 1038-1042.
- Fingar, D. C., and Blenis, J. (2004). Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 23, 3151-3171.
- Gilliland, D. G., and Griffin, J. D. (2002). The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 100, 1532-1542.
- Gilliland, D. G., and Tallman, M. S. (2002). Focus on acute leukemias. *Cancer Cell* 1, 417-420.

- Gingras, A. C., Raught, B., and Sonenberg, N. (2001). Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev* 15, 807-826.
- Gouilleux-Gruart, V., Gouilleux, F., Desaint, C., Claisse, J. F., Capiod, J. C., Delobel, J., Weber-Nordt, R., Dusanter-Fourt, I., Dreyfus, F., Groner, B., and Prin, L. (1996). STAT-related transcription factors are constitutively activated in peripheral blood cells from acute leukemia patients. *Blood* 87, 1692-1697.
- Graff, J. R., Konicek, B. W., McNulty, A. M., Wang, Z., Houck, K., Allen, S., Paul, J. D., Hbaiu, A., Goode, R. G., Sandusky, G. E., *et al.* (2000). Increased AKT activity contributes to prostate cancer progression by dramatically accelerating prostate tumor growth and diminishing p27Kip1 expression. *J Biol Chem* 275, 24500-24505.
- Grimwade, D., Walker, H., Harrison, G., Oliver, F., Chatters, S., Harrison, C. J., Wheatley, K., Burnett, A. K., and Goldstone, A. H. (2001). The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood* 98, 1312-1320.
- Guzman, M. L., Neering, S. J., Upchurch, D., Grimes, B., Howard, D. S., Rizzieri, D. A., Luger, S. M., and Jordan, C. T. (2001). Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* 98, 2301-2307.
- Harousseau, J. L., Cahn, J. Y., Pignon, B., Witz, F., Milpied, N., Delain, M., Lioure, B., Lamy, T., Desablens, B., Guilhot, F., *et al.* (1997). Comparison of autologous bone marrow transplantation and intensive chemotherapy as postremission therapy in adult acute myeloid leukemia. The Groupe Ouest Est Leucemies Aigues Myeloblastiques (GOELAM). *Blood* 90, 2978-2986.
- Harris, T. E., and Lawrence, J. C., Jr. (2003). TOR signaling. *Sci STKE* 2003, re15.
- Hope, K. J., Jin, L., and Dick, J. E. (2004). Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol* 5, 738-743.
- Inoki, K., Li, Y., Xu, T., and Guan, K. L. (2003). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev* 17, 1829-1834.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M. A., and Dick, J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645-648.
- Le Gouill, S., Pellat-Deceunynck, C., Harousseau, J. L., Rapp, M. J., Robillard, N., Bataille, R., and Amiot, M. (2002). Farnesyl transferase inhibitor R115777 induces apoptosis of human myeloma cells. *Leukemia* 16, 1664-1667.
- Legrand, O., Perrot, J. Y., Simonin, G., Baudard, M., and Marie, J. P. (2001). JC-1: a very sensitive fluorescent probe to test Pgp activity in adult acute myeloid leukemia. *Blood* 97, 502-508.

Leith, C. P., Kopecky, K. J., Chen, I. M., Eijdens, L., Slovak, M. L., McConnell, T. S., Head, D. R., Weick, J., Grever, M. R., Appelbaum, F. R., and Willman, C. L. (1999). Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood* 94, 1086-1099.

Leith, C. P., Kopecky, K. J., Godwin, J., McConnell, T., Slovak, M. L., Chen, I. M., Head, D. R., Appelbaum, F. R., and Willman, C. L. (1997). Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group study. *Blood* 89, 3323-3329.

Levis, M., Pham, R., Smith, B. D., and Small, D. (2004). In vitro studies of a FLT3 inhibitor combined with chemotherapy: sequence of administration is important in order to achieve synergistic cytotoxic effects. *Blood*.

Li, S., Sonenberg, N., Gingras, A. C., Peterson, M., Avdulov, S., Polunovsky, V. A., and Bitterman, P. B. (2002). Translational control of cell fate: availability of phosphorylation sites on translational repressor 4E-BP1 governs its proapoptotic potency. *Mol Cell Biol* 22, 2853-2861.

Liang, J., Zubovitz, J., Petrocelli, T., Kotchetkov, R., Connor, M. K., Han, K., Lee, J. H., Ciarallo, S., Catzavelos, C., Beniston, R., *et al.* (2002). PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* 8, 1153-1160.

Lowenberg, B. (1996). Treatment of the elderly patient with acute myeloid leukaemia. *Baillieres Clin Haematol* 9, 147-159.

Lowenberg, B., Downing, J. R., and Burnett, A. (1999). Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 341, 1051-1062.

Luo, J., Manning, B. D., and Cantley, L. C. (2003). Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell* 4, 257-262.

Majumder, P. K., Febbo, P. G., Bikoff, R., Berger, R., Xue, Q., McMahon, L. M., Manola, J., Brugarolas, J., McDonnell, T. J., Golub, T. R., *et al.* (2004). mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways. *Nat Med* 10, 594-601.

Mayer, R. J., Davis, R. B., Schiffer, C. A., Berg, D. T., Powell, B. L., Schulman, P., Omura, G. A., Moore, J. O., McIntyre, O. R., and Frei, E., 3rd (1994). Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B. *N Engl J Med* 331, 896-903.

Mayo, L. D., and Donner, D. B. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11598-11603.

Meek, S. E., Lane, W. S., and Piwnicka-Worms, H. (2004). Comprehensive proteomic analysis of interphase and mitotic 14-3-3 binding proteins. *J Biol Chem*.

- Milella, M., Kornblau, S. M., Estrov, Z., Carter, B. Z., Lapillonne, H., Harris, D., Konopleva, M., Zhao, S., Estey, E., and Andreeff, M. (2001). Therapeutic targeting of the MEK/MAPK signal transduction module in acute myeloid leukemia. *J Clin Invest* 108, 851-859.
- Mohi, M. G., Boulton, C., Gu, T. L., Sternberg, D. W., Neuberger, D., Griffin, J. D., Gilliland, D. G., and Neel, B. G. (2004). Combination of rapamycin and protein tyrosine kinase (PTK) inhibitors for the treatment of leukemias caused by oncogenic PTKs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3130-3135.
- Myers, M. P., Pass, I., Batty, I. H., Van der Kaay, J., Stolarov, J. P., Hemmings, B. A., Wigler, M. H., Downes, C. P., and Tonks, N. K. (1998). The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13513-13518.
- Neshat, M. S., Mellinghoff, I. K., Tran, C., Stiles, B., Thomas, G., Petersen, R., Frost, P., Gibbons, J. J., Wu, H., and Sawyers, C. L. (2001). Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10314-10319.
- O'Farrell, A. M., Foran, J. M., Fiedler, W., Serve, H., Paquette, R. L., Cooper, M. A., Yuen, H. A., Louie, S. G., Kim, H., Nicholas, S., *et al.* (2003). An innovative phase I clinical study demonstrates inhibition of FLT3 phosphorylation by SU11248 in acute myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res* 9, 5465-5476.
- Okkenhaug, K., Bilancio, A., Farjot, G., Priddle, H., Sancho, S., Peskett, E., Pearce, W., Meek, S. E., Salpekar, A., Waterfield, M. D., *et al.* (2002). Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110delta PI 3-kinase mutant mice. *Science* 297, 1031-1034.
- Ozer, H., Armitage, J. O., Bennett, C. L., Crawford, J., Demetri, G. D., Pizzo, P. A., Schiffer, C. A., Smith, T. J., Somlo, G., Wade, J. C., *et al.* (2000). 2000 update of recommendations for the use of hematopoietic colony-stimulating factors: evidence-based, clinical practice guidelines. American Society of Clinical Oncology Growth Factors Expert Panel. *J Clin Oncol* 18, 3558-3585.
- Passeques, E., Jamieson, C. H., Ailles, L. E., and Weissman, I. L. (2003). Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 1, 11842-11849.
- Plas, D. R., and Thompson, C. B. (2003). Akt activation promotes degradation of tuberlin and FOXO3a via the proteasome. *J Biol Chem* 278, 12361-12366.
- Puri, K. D., Doggett, T. A., Douangpanya, J., Hou, Y., Tino, W. T., Wilson, T., Graf, T., Clayton, E., Turner, M., Hayflick, J. S., and Diacovo, T. G. (2004). Mechanisms and implications of phosphoinositide 3-kinase delta in promoting neutrophil trafficking into inflamed tissue. *Blood* 103, 3448-3456.
- Romashkova, J. A., and Makarov, S. S. (1999). NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 401, 86-90.
- Ruggero, D., Montanaro, L., Ma, L., Xu, W., Londei, P., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P. P. (2004). The translation factor eIF-4E promotes tumor formation and cooperates with c-Myc in lymphomagenesis. *Nat Med* 10, 484-486.

- Sadhu, C., Dick, K., Tino, W. T., and Staunton, D. E. (2003a). Selective role of PI3K delta in neutrophil inflammatory responses. *Biochem Biophys Res Commun* 308, 764-769.
- Sadhu, C., Masinovsky, B., Dick, K., Sowell, C. G., and Staunton, D. E. (2003b). Essential role of phosphoinositide 3-kinase delta in neutrophil directional movement. *J Immunol* 170, 2647-2654.
- Sawyer, C., Sturge, J., Bennett, D. C., O'Hare, M. J., Allen, W. E., Bain, J., Jones, G. E., and Vanhaesebroeck, B. (2003). Regulation of breast cancer cell chemotaxis by the phosphoinositide 3-kinase p110delta. *Cancer Res* 63, 1667-1675.
- Schalm, S. S., and Blenis, J. (2002). Identification of a conserved motif required for mTOR signaling. *Curr Biol* 12, 632-639.
- Shaw, R. J., Bardeesy, N., Manning, B. D., Lopez, L., Kosmatka, M., DePinho, R. A., and Cantley, L. C. (2004). The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell* 6, 91-99.
- Sievers, E. L., Larson, R. A., Stadtmauer, E. A., Estey, E., Lowenberg, B., Dombret, H., Karanes, C., Theobald, M., Bennett, J. M., Sherman, M. L., *et al.* (2001). Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol* 19, 3244-3254.
- Slovak, M. L., Kopecky, K. J., Cassileth, P. A., Harrington, D. H., Theil, K. S., Mohamed, A., Paietta, E., Willman, C. L., Head, D. R., Rowe, J. M., *et al.* (2000). Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 96, 4075-4083.
- Stone, R. M., De Angelo, J., Galinsky, I., Estey, E., Klimek, V., Grandin, W., Lebwohl, D., Yap, A., Cohen, P., Fox, E., *et al.* (2004). PKC 412 FLT3 inhibitor therapy in AML: results of a phase II trial. *Ann Hematol* 83 Suppl 1, S89-90.
- Suciu, S., Mandelli, F., de Witte, T., Zittoun, R., Gallo, E., Labar, B., De Rosa, G., Belhabri, A., Giustolisi, R., Delarue, R., *et al.* (2003). Allogeneic compared with autologous stem cell transplantation in the treatment of patients younger than 46 years with acute myeloid leukemia (AML) in first complete remission (CR1): an intention-to-treat analysis of the EORTC/GIMEMAAML-10 trial. *Blood* 102, 1232-1240.
- Tran, H., Brunet, A., Griffith, E. C., and Greenberg, M. E. (2003). The many forks in FOXO's road. *Sci STKE* 2003, RE5.
- Vanhaesebroeck, B., Welham, M. J., Kotani, K., Stein, R., Warne, P. H., Zvelebil, M. J., Higashi, K., Volinia, S., Downward, J., and Waterfield, M. D. (1997). P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4330-4335.
- Vardiman, J. W., Harris, N. L., and Brunning, R. D. (2002). The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 100, 2292-2302.

- Vivanco, I., and Sawyers, C. L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 489-501.
- Warrell, R. P., Jr., de The, H., Wang, Z. Y., and Degos, L. (1993). Acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* 329, 177-189.
- Weick, J. K., Kopecky, K. J., Appelbaum, F. R., Head, D. R., Kingsbury, L. L., Balcerzak, S. P., Bickers, J. N., Hynes, H. E., Welborn, J. L., Simon, S. R., and Grever, M. (1996). A randomized investigation of high-dose versus standard-dose cytosine arabinoside with daunorubicin in patients with previously untreated acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* 88, 2841-2851.
- Wendel, H. G., De Stanchina, E., Fridman, J. S., Malina, A., Ray, S., Kogan, S., Cordon-Cardo, C., Pelletier, J., and Lowe, S. W. (2004). Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. *Nature* 428, 332-337.
- Xu, Q., Simpson, S. E., Scialla, T. J., Bagg, A., and Carroll, M. (2003). Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood* 102, 972-980.
- Yonezawa, K., Tokunaga, C., Oshiro, N., and Yoshino, K. (2004). Raptor, a binding partner of target of rapamycin. *Biochem Biophys Res Commun* 313, 437-441.
- Zhang, X., Shu, L., Hosoi, H., Murti, K. G., and Houghton, P. J. (2002). Predominant nuclear localization of mammalian target of rapamycin in normal and malignant cells in culture. *J Biol Chem* 277, 28127-28134.
- Zhao, S., Konopleva, M., Cabreira-Hansen, M., Xie, Z., Hu, W., Milella, M., Estrov, Z., Mills, G. B., and Andreeff, M. (2004). Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase dephosphorylates BAD and promotes apoptosis in myeloid leukemias. *Leukemia* 18, 267-275.

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE PHARMACIE

Année de la soutenance
2004

Nom - Prénoms : PRIE Nolwen, Carole

**Titre de la thèse : Les voies PI3K et mTOR dans les leucémies aiguës myéloïdes :
rôles et mécanismes d'activation.**

Résumé de la thèse :

Les leucémies aiguës myéloblastiques (LAMs) sont des hémopathies malignes, dérivées de progéniteurs hématopoïétiques de la lignée myéloïde, bloqués à des stades variables de leur différenciation. Une activation constitutive de la voie PI3K/Akt a été démontrée dans environ 50 % des cas de LAMs. De plus l'utilisation d'un inhibiteur chimique de la PI3K, le LY294002, montre que cette activation constitutive confère aux cellules blastiques un avantage prolifératif et de survie.

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'activation des PI3K dans les LAMs, l'expression des différentes isoformes α , β , et δ des PI3K de classe Ia a été étudiée. Seule l'isoforme p110 δ de la PI3K est constamment exprimée dans les cellules leucémiques. Un inhibiteur spécifique de la p110 δ , l'IC87114, supprime complètement la phosphorylation d'Akt dans les cellules blastiques PI3K+, et inhibe leur prolifération sans induire leur apoptose. En revanche, il n'inhibe pas la prolifération des cellules leucémiques PI3K-, ni celle des cellules CD34+ de sang placentaire. Ces résultats démontrent l'importance de l'isoforme p110 δ dans le contrôle de la prolifération des blastes PI3K+.

Par ailleurs, une phosphorylation constitutive des protéines P70S6K et 4E-BP1, en aval de mTOR est retrouvée dans la plupart des cellules leucémiques démontrant une activation de cette voie. Cette activation s'exerce indépendamment de l'activité PI3K observée. En effet, la phosphorylation de ces deux protéines n'est pas inhibée par l'IC87114. De plus, l'association de l'IC87114 à la rapamycine, inhibiteur de mTOR, potentialise l'effet inhibiteur des deux drogues sur la prolifération des cellules PI3K+. Le mécanisme d'activation de mTOR, indépendant d'Akt, reste à déterminer.

Ainsi, une dérégulation de l'activité traductionnelle en aval de mTOR pourrait être impliquée dans la biologie des LAMs.

Cependant, ni la voie PI3K/Akt, ni la voie mTOR ne contrôle la survie des cellules leucémiques. Il paraît donc indispensable de restaurer une voie d'apoptose dans ces cellules blastiques pour envisager l'utilisation en clinique de thérapies ciblées, comme l'IC87114 ou la rapamycine.

MOTS CLES: Leucémies aiguës myéloïdes, p110 δ , PI3K, IC87114, mTOR, rapamycine

JURY PRESIDENT : M. le Professeur Jean Marie BARD,

Faculté de Pharmacie de Nantes

ASSESEURS : M. le Professeur Hervé AVET-LOISEAU,

Faculté de Médecine de Nantes

M. le Docteur Didier BOUSCARY,

Hôpital Cochin, Paris

M. le Professeur Jean Luc HARROUSSEAU,

Faculté de Médecine de Nantes

Adresse de l'auteur : 15, rue Yves Montand 49000 Angers