UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Ecole doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie, Imageries

UMRS-1147 «Médecine Personnalisée, Pharmacogénomique et Optimisation Thérapeutique»

THESE DE DOCTORAT DE PHARMACOLOGIE

Présentée et soutenue publiquement le 27 octobre 2017 par

Ana A. FERNÁNDEZ RAMOS

Influence des médicaments immunosuppresseurs (6-mercaptopurine, acide mycophénolique et rapamycine) sur la reprogrammation métabolique des lymphocytes T

JURY

Monsieur le Docteur Bernard FROMENTY	Rapporteur
Monsieur le Professeur Maarten NAESENS	Rapporteur
Monsieur le Professeur Dany ANGLICHEAU	Examinateur
Madame le Docteur Fatima DJOUADI	Examinatrice
Madame le Professeur Saadia KERDINE-RÖMER	Examinatrice
Madame le Professeur Marie-Anne LORIOT	Directrice de Thèse
Monsieur le Docteur Nicolas PALLET	Co-encadrant

Table des matières

LISTE DES PUBLICATIONS 5
LISTE DES PARTICIPATIONS AUX CONGRES 6
LISTE DES ABREVIATIONS 7
LISTE DES FIGURES 11
LISTE DES TABLES 12

INTRODUCTION 13

I. Le système immunitaire 15
I.1. Le système immunitaire adaptatif 15
I.1.1. Formation des récepteurs des lymphocytes T et B 16
I.1.2. Les lymphocytes T 17
I.1.3. Les lymphocytes B 23

II. La reprogrammation métabolique 24
II.1. Introduction 24
II.2. Reprogrammation métabolique: redécouverte de la biochimie élémentaire dans les cellules qui prolifèrent 24
II.2.1. Données générales sur le métabolisme des cellules cancéreuses 26
II.2.2. La synthèse des nucléotides 31
II.3. Les «checkpoints» métaboliques 34
II.3.1. AMPK 35
II.3.2. PI3K/Akt 35
II.3.3. mTOR 36
II.3.4. HIF-1α 37
II.3.5. Myc 38
II.4. La reprogrammation métabolique dans les lymphocytes T 39
II.4.1. Métabolisme des lymphocytes T 39
II.4.2. Régulation du métabolisme lymphocytaire par les «checkpoints» métaboliques .42
II.4.3. Métabolisme et différenciation des lymphocytes T 44

III. Pathologies et altérations du système immunitaire 47
III.1. Maladies auto-immunes 47
III.1.1. Mécanismes de tolérance 47
III.1.2. Maladies auto-immunes 49
III.2. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin 53
III.2.1. Etiologie 53

III.2.2. Immunobiologie des MICI 57
III.2.3. Implications cliniques 61
III.2.4. Prise en charge thérapeutique des MICI 62
III.3. Transplantation d'organes 63
III.3.1.Transplantation dans l'Union Européenne et dans le monde 64
III.3.2. Transplantation rénale 65

IV. Les médicaments immunosuppresseurs 72
IV.1. La 6-mercaptopurine 72
IV.1.1. Découverte des thiopurines 72
IV.1.2. Structures chimiques 72
IV.1.3. Propriétés pharmacologiques 73
IV.1.4. Indications thérapeutiques 79
IV.1.5. Effets indésirables 80
IV.1.6. Effets sur le métabolisme cellulaire 81
IV.2. L'acide mycophénolique 82
IV.2.1. Découverte de l'acide mycophénolique 82
IV.2.2. Structures chimiques 82
IV.2.3. Propriétés pharmacologiques 83
IV.2.4. Indications thérapeutiques 86
IV.2.5. Effets indésirables 87
IV.2.6. Effets sur le métabolisme cellulaire 87
IV.3. Les inhibiteurs de la calcineurine 88
IV.3.1. Découverte des inhibiteurs de la calcineurine 88
IV.3.2. Structures chimiques 89
IV.3.3. Propriétés pharmacologiques 89
IV.3.4. Indications thérapeutiques 95
IV.3.5. Effets indésirables 96
IV.3.6. Effets sur le métabolisme cellulaire 96
IV.4. La rapamycine 98
IV.4.1. Découverte des inhibiteurs de mTOR 98
IV.4.2. Structure chimique 99
IV.4.3. Propriétés pharmacologiques 99
IV.4.4. Indications thérapeutiques 102
IV.4.5. Effets indésirables 103
IV.4.6. Effets sur le métabolisme cellulaire 103

OBJECTIFS 105

TRAVAUX DE RECHERCHE 109

Article 0 111
Article 1 129
Article 2 145
Article 3 167

DISCUSSION 189

I. Modèle cellulaire: la lignée Jurkat, intérêts et limites 192
II. Analyse comparative des résultats 194
III. Modulation pharmacologique du métabolisme énergétique: intérêt potentiel des «thérapies métaboliques» 197
III.1. La transplantation d'organes solides 198
III.2. Les maladies auto-immunes: l'exemple du lupus érythémateux disséminé 199
III.3. Les MICI 200
IV. Reprogrammation métabolique et traitements anti-cancéreux: influence du métabolisme des lymphocytes T 202

PERPECTIVES ET CONCLUSIONS 205

Perspectives 207
Conclusions 209

ANNEXE 211

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 215

Liste des Publications

Article 0 (article original)

«Molecular insight into thiopurine resistance: transcriptomic signature in lymphoblastoid cell lines»

Chouchana L, Fernández-Ramos AA, Dumont F, Laurent-Marchetti C, Ceballos-Picot I, Beaune P, Gurwitz D, Loriot MA. *Genome Medicine*. 2015. 7(37):1-12.

Facteur d'impact: 7,07

Article 1 (revue de la littérature)

«The effect of immunosuppressive molecules on T-cell metabolic reprogramming»

Fernández-Ramos AA, Poindessous V, Laurent-Marchetti C, Pallet N, Loriot MA. *Biochimie*. 2016; 127: 23-36.

Facteur d'impact: 3,11

Article 2 (article original)

«6-mercaptopurine promotes energetic failure in proliferating T cells»

Fernández-Ramos AA, Marchetti-Laurent C, Poindessous V, Antonio S, Laurent-Puig P, Bortoli S, Loriot MA, Pallet N. *Oncotarget.* 2017. 8(26):43048-43060. DOI: 10.18632/oncotarget.17889

Facteur d'impact: 5,17

Article 3 (article original)

«A comprehensive characterization of the impact of mycophenolic acid on the metabolism of Jurkat T cells»

Fernández-Ramos AA, Marchetti-Laurent C, Poindessous V, Antonio S, Petitgas C, Ceballos-Picot I, Laurent-Puig P, Bortoli S, Loriot MA, Pallet N. *Scientific Reports*. 2017. Accepted.

Facteur d'impact: 4,25

Liste des Participations aux congrès

- **27-28/06/2016, Paris: Journées scientifiques de l'Ecole Doctorale MTCI**

Immunosuppressive drugs (6-MP, MPA, rapamycin) act as modulators of metabolic reprogramming in Jurkat cells (Poster)

- **03-06/06/2017, Madrid: ERA-EDTA (European renal association – European dialysis and transplant) 54th Congress**

Immunosuppressive drugs (6-MP, MPA, Rapa) act as modulators of metabolic reprogramming in Jurkat T cell line (Poster)

- **22-25/06/2017, Madrid: EHA (European hematology association) 22nd Congress**

6-mercaptopurine promotes energetic failure in leukemic T-cell line Jurkat (Abstract)

- **24-27/09/2017, Barcelona: ESOT (European society for organ transplantation) 18th Congress**

Impact of mycophenolic acid on T-cell metabolic reprogramming (Brief oral presentation)

- **9-13/10/2017, Nice: SFNDT (Société francophone de néphrologie, dialyse et transplantation) 2ème Congrès**

Impact du MPA sur la reprogrammation métabolique des cellules T (Poster)

Liste des Abréviations

2-DG: 2-désoxyglucose
4EBP1: eukariotic initiation factor 4E binding protein
6-Me-8OH-MP:6-méthylmercapto-8-hydroxypurine
6-MMP: 6-méthylmercaptopurine
6-MP: 6-mercaptopurine
6-TG: 6-thioguanine
6-TGN: 6-thioguanine nucléotides
6-thioGTP: 6-thioguanine triphosphate
6-TIMP: 6-thioinosine monophosphate

ABCB1: ATP-binding cassette sub-family B member 1 ou MDR1 ou P-gp
ACC: acétyl-CoA carboxylase
AcMPAG: métabolite acyl glucuronide
ADA: adénosine deaminase
ADN: acide désoxyribonucléique
ADP: adénosine diphosphate
AICAR: aminoimidazole carboxamide ribonucleotide ou ZMP
AIRE: auto-immune regulator
Akt: protéine kinase B ou PKB
ALD: aldehyde déshydrogénase
ALPS: syndrome lymphoprolifératif avec auto-immunité
AMP: adénosine monophosphate
AMPK: protéine kinase activée par l'AMP
AOX: aldéhyde oxydase
AP-1: protéine activatrice 1
APS-1: syndrome auto-immun sévère
ARN: acide ribonucléique
ARNm: acide ribonucléique messager
ASCT2: transporteur des acides aminés neutre (SLC1A5)
ATCC: American Type Culture Collection
ATG16L1: autophagy-related, 16-like
ATP: adénosine triphosphate
ATPase: adénosine triphosphatase
AZA: azathioprine

BCR: récepteur des cellules B
bHLH: basic helix-loop-helix
Bregs: cellules B régulatrices

CA9: anhydrase carbonique 9
CAD: carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase et dihydroorotase
CARD (15): caspase recruitment domain (containing protein 15)
CD: cellules dendritiques
CMH: complexe majeur d'histocompatibilité
CO_2: dioxyde de carbone
CPA: cellule présentatrice d'antigène
CPIC: Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium
CPT1A: carnitine palmitoyl-transférase 1A
CTLA-4: antigène 4 du lymphocyte T
CTP: cytidine triphosphate
CTPS: cytidine triphosphate synthetase
CYP3A4/5: cytochrome P450 3A4/5

DATP: désoxyadénosine triphosphate
dGTP: désoxyguanosine triphosphate
DON: 6-diazo-5-oxo-L-norleucine
DRO: dérivés réactifs de l'oxygène

EBV: virus Epstein-Barr
EMA: European Medicines Agency
ENO1: enolase 1

F1,6BP: fructose 1,6-biphosphate
F2,6BP: fructose 2,6-biphosphate
F6P: fructose-6-phosphate
$FADH_2$: flavine adénine dinucléotide
FASN: acid gras synthase
FDA: Food and Drug Administration
FKBP12: 12kDa FK506 binding protein
FOXP3: forkhead box protein 3

G3P: glycéraldehyde-3-phosphate
G6P: glucose-6-phosphate
G6PD: glucose-6-phosphate déshydrogénase
GAPDH: glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GLS (1): glutaminases (1)
GLUD1: glutamate déshydrogénase
GLUT1/3/4: transporteur du glucose 1/3/4 ou SLC2A1/3/4, solute carrier family 2 member 1/3/4
GMP: guanosine monophosphate
GO: Gene Ontology
GPI: glucose-6-phosphate isomérase
GST: glutathiones S-transférases
GTP: guanosine triphosphate
GVHD: maladie du greffon contre l'hôte

HIF-1α: facteur inductible par l'hypoxie 1 α
HIF-1β: facteur inductible par l'hypoxie 1 β
HK1 ou HK2: héxokinase de type 1 ou 2
HLA: antigènes des leucocytes humains
HMC: human mast cell line
HPLC: chromatographie en phase liquide à haute performance
HPRT: hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase
HRE: éléments de réponse à l'hypoxie
HUVEC: human umbilical vein endothelial cells

IARC: International Agency of Research on Cancer
IFN: interférons
IFNγ: interferon gamma
IL: interleukines
IL-2R/IL-23R: récepteur à l'IL-2/23
IM: intramusculaire
IMC: index de masse corporelle
IMP: inosine monophosphate
IMPDH: IMP déshydrogénase
IPEX: immune dysregulation, polyendocrinopathy, autoimmune enteropathy X-linked
IRGM: immunity-related GTPase M protein
ITPA: inosine triphosphate pyrophosphatase
IV: intraveineuse

JAK/STAT: Janus-associated kinase-signal transducers and activators of transcription
JNK: c-Jun N-terminal kinase

KO: knock-out

LAL: leucémie aiguë lymphoblastique
LAM: leucémie aiguë myéloblastique
LAT1: transporteur humain d'acides aminés de type L 1 ou SLC7A5
LC-MS: chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse
LCL: lignées cellulaires lymphoblastoïdes
LDH (A/B): lactate déshydrogénase (A/B)
LED: lupus érythémateux disséminé
LMC: leucémie myéloïde chronique
LPS: lipopolysaccharide

MAPK: mitogen-activated protein kinases
MAX: c-myc associated protein X
MC: maladie de Crohn
MCT1/4: transporteur 1/4 de monocarboxylate
MDP: muramyl dipeptide
MDR1: protéine de résistance à différents médicaments ou ABCB1 ou P-gp
MDSC: cellules myéloïdes suppressives
MICI: maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
mLST8: mammalian lethal with Sec13 protein 8
MMF: mycophénolate mofetil
MPA: acide mycophénolique
MPAG: acide glucuronide 7-O-mycophénolique
MPS: mycophenolate sodium
MRP-2: protéine de multi-résistance 2
MTHFR: 5,10-méthylènetétrahydrofolate réductase
mTOR: cible de la rapamycine chez les mammifères
mTORC1/2: cible de la rapamycine complexe 1/2
mTORi: inhibiteurs de mTOR
MTX: méthotrexate

NAD$^+$: nicotinamide adénine dinucléotide (oxydé)
NADH: nicotinamide adénine dinucléotide (réduite)
NADPH: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (réduite)
NFAT: facteur nucléaire des lymphocytes T activés
NF-κB: facteur nucléaire stimulateur des chaînes légères kappa des cellules B activées
NIH: Institut National de Santé
NK: natural killer ou tueur naturel
NOD2: nucleotide-binding oligomerization domain 2
NR4A: récepteurs orphelins nucléaires
NUDT15: nudix hydrolase 15

O_2: oxygène
OAT: transporteurs organiques d'anions
OATP: transporteurs organiques de polypeptides anioniques
ODC: ornithine decarboxylase
OXPHOS: phosphorylation oxidative

P70s6k: ribosomal s6 kinase
PAMPs: motifs moléculaires associés aux pathogènes
PAS: Per-Arnt-Sim
PBMC: cellules mononucléées du sang périphérique
PD-1: programmed cell death protein 1
PD-L1/2: programmed death-ligand 1/2
PDH: pyruvate déshydrogénase
PDK: pyruvate déshydrogénases kinases

PEP: phosphoenolpyruvate
PFK (1 ou 2): phosphofructokinase (1 ou 2)
PFKFB3: 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase isoforme 3
PGAM: phosphoglycerate mutase
PGK: phoshpoglycerate kinase
P-gp: P-glycoprotéine ou MDR1 ou ABCB1
PHD (2): prolyl hydroxylase (domain 2)
PI3K: phosphoinositide 3-kinase
PKM2: pyruvate kinase 2
PPIases: immunophilines avec une fonction cis/trans-peptidylpropyl isomérases
PPK: polyphosphate kinase
PR: polyarthrite rhumatoïde
PRAS40: proline-rich Akt substrate of 40 kDa
PRPP synthétase: 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate synthétase
PRPP: 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate
PRR: récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires
PTEN: phosphatase and tensin homolog

QPCR: quantitative polymerase chain reaction

R5P: ribose-5-phosphate
RAG1 ou RAG2: recombination-activating gene 1 ou 2
Raptor: regulatory-associated protein of mTOR
RCH: rectocolite hemorragique
RhoGTPase: Rho guanosine triphosphatase

SAM: S-adénosylméthionine
SEP: sclérose en plaques
SHIP: SH2-domain-containing inositol polyphosphate 5'phosphatase
SLC3A2: solute carrier family 3 member 2
SLC38A1: solute carrier family 38 member 1
SLC7A5: solute carrier family 7 member 5 ou LAT1
SN2: transporteur de glutamine du système N2
SNP: single nucleotide polymorphism
SREBP1: sterol regulatory element-binding protein 1
STAT3: transducteur de signal et activateur de la transcription 3

Tc: cellules T cytotoxiques
TCR: récepteur des cellules T
TFAM: facteur de transcription mitochondrial A
TGDP: 6-thioguanine diphosphate
TGF-β1: facteur de croissance transformant β1
TGMP: 6-thioguanine monophosphate
TGTP: 6-thioguanine triphosphate
Th: cellules T auxiliaires ou helper
Th0: cellules T naïfs
Th1: cellules T helper 1
Th17: cellules T helper 17
Th2: cellules T helper 2
TILs: lymphocytes infiltrés
TKT: transkétolase
TLR: récepteur de type Toll
TNF: facteur de nécrose tumorale
TOR1 ou TOR2: cible de la rapamycine 1 ou 2
TPI: triosephosphate isomérase
TPMT: thiopurine S-methyltransférase
TRAF: tumour necrosis factor receptor-associated factor 6
Treg: cellules T régulatrices

UDP: uridine diphosphate
UGT: UDP-glucuronosyltransférases
UMP: uridine monophosphate
UTP: uridine triphosphate

VHL: von Hippel-Lindau

XO: xanthine oxydase

Liste des Figures

FIGURE 1. Développement et rôle des lymphocytes T et B dans le système immunitaire adaptatif. 16
FIGURE 2. Développement des lymphocytes T dans le thymus. 18
FIGURE 3. Voies d'activation des lymphocytes T. 20
FIGURE 4. Différenciation des lymphocytes T $CD4^+$ selon le contexte des cytokines. 21
FIGURE 5. Représentation schématique du métabolisme glycolytique selon les différents types cellulaires. 25
FIGURE 6. Représentation simplifiée des voies du métabolisme. 29
FIGURE 7. Représentation schématique de la synthèse *de novo* des purines. 33
FIGURE 8. Les «checkpoints» métaboliques et leurs rôles dans le métabolisme cellulaire. 34
FIGURE 9. Variations du métabolisme des lymphocytes T au cours d'une réponse immunitaire. 40
FIGURE 10. La différenciation des lymphocytes T est régulée par les «checkpoints» métaboliques. 45
FIGURE 11. Etapes de la progression au cours de la pathogénèse des MICI. 54
FIGURE 12. Cellules impliquées dans les mécanismes de défense de la barrière épithéliale intestinale. 58
FIGURE 13. Cibles pharmacologiques des médicaments immunosuppresseurs dans la cascade d'activation des lymphocytes T. 70
FIGURE 14. Évolution de la prescription des médicaments immunosuppresseurs utilisés dans la phase de maintenance après transplantation rénale chez l'adulte. 71
FIGURE 15. Structures chimiques de la purine et des thiopurines. 73
FIGURE 16. Métabolisme des thiopurines. 74
FIGURE 17. Effets cellulaires de la 6-MP et de ses principaux métabolites. 77
FIGURE 18. Structures chimiques du MPA, MMF et MPS. 83
FIGURE 19. Voie de synthèse des purines et action du MPA. 85
FIGURE 20. Structure chimique des inhibiteurs de la calcineurine: la ciclosporine et le tacrolimus. 89
FIGURE 21. Représentation schématique du métabolisme intestinal et hépatique de la ciclosporine et du tacrolimus. 91
FIGURE 22. Mécanismes d'action du tacrolimus et de la ciclosporine. 92
FIGURE 23. Structures chimiques du sirolimus (rapamycine) et de l'évérolimus. 99
FIGURE 24. Rôles cellulaires des complexes mTORC1 et mTORC2 et effets de la rapamycine. 101
FIGURE 25. Action des molécules sur le métabolisme en cours d'essais cliniques. 198
FIGURE 26. Schéma représentatif des effets des trois médicaments sur les «checkpoints» métaboliques et le métabolisme cellulaire. 209

Liste des Tables

TABLEAU 1. Synthèse des voies métaboliques. 27
TABLEAU 2. Rôles des «checkpoints» métaboliques dans le métabolisme des lymphocytes T. 43
TABLEAU 3. Mécanismes de tolérance des lymphocytes T et B. 48
TABLEAU 4. Gènes associés à des maladies auto-immunes monogéniques. 51
TABLEAU 5. Principaux gènes de susceptibilité pour les MICI. 56
TABLEAU 6. Organes transplantés par million d'habitants en 2014 dans les pays de l'Europe appartenant à la «South Alliance for Transplants». 65
TABLEAU 7. Synthèse des résultats de la 6-MP, le MPA et la rapamycine dans la lignée lymphocytaire T Jurkat. 195

INTRODUCTION

I. Le système immunitaire

Le système immunitaire est schématiquement subdivisé entre système inné et adaptatif, bien que la distinction entre ces deux parties soit difficile. Dans ce chapitre nous développerons plus en détail la partie concernant le système immunitaire adaptatif.

Le système immunitaire inné est la première réponse rapide à une infection. La peau et les muqueuses constituent les premiers éléments des mécanismes de défense. Mais, si les pathogènes échappent à cette première barrière, les cellules du système immunitaire inné dans le sang et la lymphe peuvent les identifier grâce aux récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires PRR (de l'anglais, pattern recognition receptors) qui reconnaissent les motifs moléculaires associés aux pathogènes PAMPs (de l'anglais, pathogen-associated molecular patterns) exprimés à la surface des pathogènes. Les mastocytes, les macrophages, les cellules dendritiques (CD), les monocytes, les neutrophiles, les basophiles, les éosinophiles et les lymphocytes NK (de l'anglais, Natural Killer) sont impliqués dans la réponse du système immunitaire inné. De plus, le système du complément joue un rôle important dans l'immunité innée. Il comporte une vingtaine de glycoprotéines, activées en cascade suivant des étapes d'amplification avec une fonction principale de lyse de la membrane des pathogènes. Pour plus de détails: [Parkin and Cohen 2001, Rye et al. 2016].

La reconnaissance des PAMPs par les PRRs des macrophages ou des cellules dendritiques implique le relargage de cytokines, messagers chimiques qui régulent la différenciation cellulaire, la prolifération et l'expression de gènes. Plus de 40 cytokines différentes ont été répertoriées chez l'Homme, classées principalement en interférons (IFN) ou interleukines (IL), ces dernières faisant le lien entre le système immunitaire inné et adaptatif [Parkin and Cohen 2001, Rye et al. 2016].

I.1. Le système immunitaire adaptatif

Le système immunitaire adaptatif est un système de réponse basé sur la reconnaissance spécifique des antigènes par les récepteurs des lymphocytes T et B. Il n'est retrouvé que chez l'infra-embranchement des Gnathostomata (règne animal, embranchement chordé, sous-embranchement vertébré), comme une deuxième réponse plus tardive (quelques jours ou semaines). La réponse peut être cellulaire, *via* les lymphocytes T, ou humorale, *via* les lymphocytes B activés et les anticorps. De plus, le système immunitaire possède une mémoire immunologique, c'est-à-dire qu'il est capable de protéger l'hôte contre une réinfection, en déclenchant une réponse beaucoup plus rapide [Parkin and Cohen 2001, Rye et al. 2016].

Dans un premier temps, l'antigène est présenté et reconnu spécifiquement par les récepteurs des lymphocytes T ou B, induisant une activation et une différenciation des lymphocytes, normalement présents dans le tissu lymphoïde. Ensuite, apparaît une réponse effectrice par les lymphocytes T ou B dans le site d'inflammation (**Figure 1**) [Parkin and Cohen 2001].

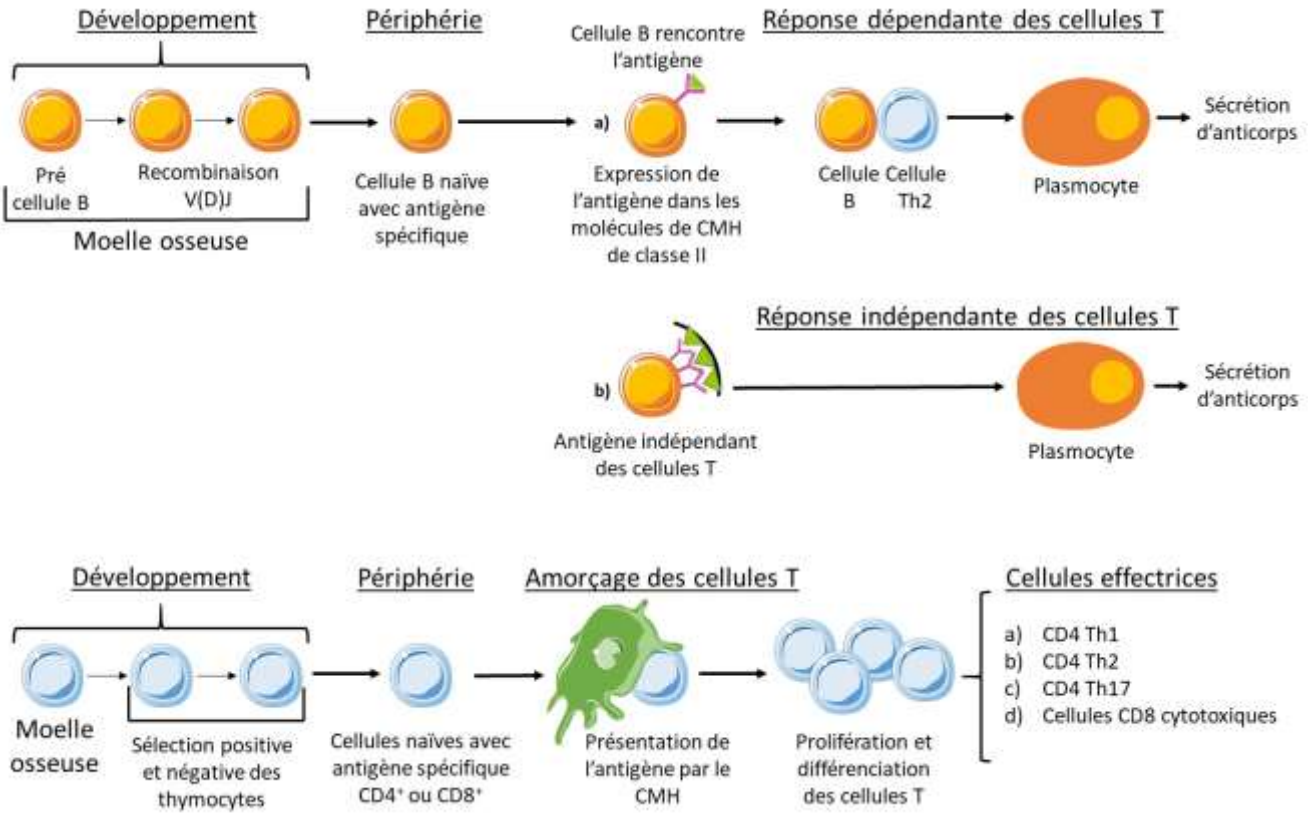


Figure 1. Développement et rôle des lymphocytes T et B dans le système immunitaire adaptatif.

Les cellules B commencent leur ontogénie dans la moëlle osseuse et ensuite vont migrer en périphérie où elles vont présenter un antigène spécifique. Après, deux options sont possibles pour sécréter les anticorps, dépendant ou indépendant des cellules T. Pour les lymphocytes T, le développement débute dans la moëlle osseuse et après sélection positive et négative, ils vont migrer en périphérie sous forme $CD4^+$ ou $CD8^+$ naïfs. La cellule présentatrice d'antigène présente l'antigène au lymphocyte T par le complexe majeur d'histocompatibilité, ce qui va induire la prolifération et la différenciation en cellules T effectrices. CMH: complexe majeur d'histocompatibilité; D: diversité; J: liaison; V: variable. Modifiée de: [Parkin and Cohen 2001].

I.1.1. Formation des récepteurs des lymphocytes T et B

Les lymphocytes T et B se forment dans la moelle osseuse. Les lymphocytes T migrent vers le thymus pour se développer, tandis que les cellules B restent dans la moelle osseuse.

La formation des récepteurs spécifiques, le récepteur des cellules B BCR (de l'anglais, B-cell receptor) pour les lymphocytes B et le récepteur des cellules T TCR (de l'anglais, T-cell receptor)

pour les lymphocytes T, est due à une recombinaison aléatoire de trois fragments géniques; V (variable), D (diversité) et J (liaison, de l'anglais joining) durant la différenciation lymphocytaire [Parkin and Cohen 2001, Goodnow et al. 2005]. A l'issue de cette première étape, les lymphocytes T et B sont dits naïfs puisqu'ils n'ont pas encore rencontré leur antigène spécifique.

I.1.2. Les lymphocytes T

- ### Le développement dans le thymus

Une fois que les lymphocytes T expriment le récepteur TCR, des étapes de maturation et de sélection ont lieu dans le thymus (**Figure 2**). Dans un premier temps, les lymphocytes qui arrivent dans le thymus sont double-négatifs ($CD4^-CD8^-$). Après interaction avec les cellules épithéliales du cortex du stroma thymique, ils deviennent double-positifs ($CD4^+CD8^+$). Une étape de sélection positive a lieu ensuite avec pour objectif de sélectionner les lymphocytes T qui réagissent moyennement avec des auto-antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), car dans les organes lymphoïdes périphériques, les lymphocytes T doivent reconnaître des auto-antigènes du CMH pour s'activer. Ainsi, s'ils réagissent avec le CMH de classe I, ils seront $CD8^+$ et s'ils réagissent avec le CMH de classe II, ils deviendront $CD4^+$ [Parkin and Cohen 2001, Goodnow et al. 2005, Hogquist et al. 2005, Bolon 2012]. Par la suite, une étape de sélection négative est nécessaire pour éviter le relargage aux organes lymphoïdes secondaires de lymphocytes T qui se fixent aux auto-antigènes. Pour cela, les CD et les macrophages vont présenter des auto-antigènes et les lymphocytes T qui se fixent, vont subir une modification du récepteur TCR (mécanisme majoritairement basé sur la recombinaison VDJ), rentrer en anergie ou être éliminés par délétion clonale [Parkin and Cohen 2001, Hogquist et al. 2005, Bolon 2012].

Finalement, seuls les lymphocytes T qui sont issus de la double sélection, positive et négative, migreront vers les nodules lymphatiques, c'est-à-dire les organes lymphoïdes secondaires pour exercer leur rôle dans la réaction immunitaire quand ils vont reconnaître l'antigène spécifique *via* leur TCR [Parkin and Cohen 2001]. Dans certaines situations pathologiques, la sélection positive et négative peut laisser passer des lymphocytes auto-réactifs, notamment au cours des maladies auto-immunes (**III.1. Maladies auto-immunes**).

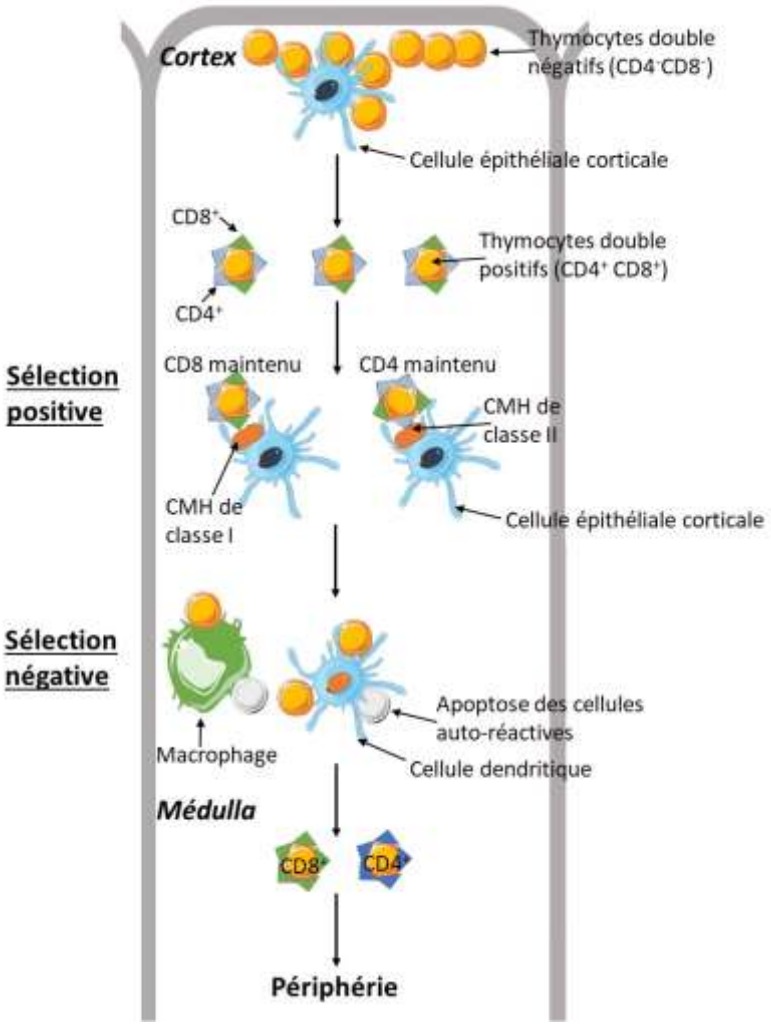


Figure 2. Développement des lymphocytes T dans le thymus.
Après sélection positive et négative dans le thymus, les lymphocytes T $CD4^+$ ou $CD8^+$ vont migrer à la périphérie. CMH: complexe majeur d'histocompatibilité. Modifiée de: [Parkin and Cohen 2001]

- La présentation antigénique

Les lymphocytes T reconnaissent les antigènes quand ils sont complexés au CMH. Le complexe antigène-CMH active les lymphocytes T par deux voies différentes: le CMH de classe I ou le CMH de classe II. Comme chaque CMH va présenter l'antigène à un type différent de lymphocyte T, avec des fonctions différentes, la molécule CMH utilisée déterminera la réponse effectrice générée.

Schématiquement, les molécules du CMH de classe I présentent des antigènes originaires du cytosol cellulaire (protéines d'origine virale ou tumorale, par exemple). L'antigène localisé dans le cytosol d'une cellule présentatrice d'antigène CPA (de l'anglais, antigen-presenting cells) est ensuite digéré sous forme de courts fragments peptidiques par le protéasome avant d'être complexé avec les protéines du CMH de classe I au niveau du réticulum endoplasmique et

transporté *via* l'appareil de Golgi à la membrane plasmique de toutes les cellules nucléées du corps. Le CMH de classe I est reconnu par les lymphocytes cytotoxiques de type $CD8^+$ [Parkin and Cohen 2001].

En ce qui concerne le CMH de classe II, l'antigène d'origine exogène est d'abord internalisé par phagocytose (pathogènes) ou endocytose puis complexé avec une molécule CMH de classe II pour subir un clivage protéolytique dans le compartiment endosomal et enfin, il est dirigé avec les protéines du CMH de classe II à la membrane plasmique des CPA. Le CMH de classe II est reconnu par les lymphocytes T $CD4^+$ [Parkin and Cohen 2001]. Les molécules du CMH de classe II sont exprimées notamment par les CD, les macrophages et les lymphocytes B. Ce sont ces cellules qui présentent les fragments peptidiques aux lymphocytes T auxiliaires Th (ou helper en anglais) qui peuvent ensuite activer les lymphocytes B pour produire des anticorps solubles qui reconnaissent l'antigène exogène, quelle que soit sa localisation dans l'organisme. Les CD immatures phagocytent les antigènes viraux et pathogènes extracellulaires dans les tissus périphériques. Ensuite, elles migrent vers les ganglions où en présence de signaux inflammatoires les CD matures vont exprimer une grande variété de molécules de co-stimulation qui favorisent la présentation de l'antigène aux lymphocytes T. Les CD sont les seules cellules capables d'activer les lymphocytes T naïfs. Les macrophages sont des cellules phagocytaires qui sont activés en présence de cytokines et de microorganismes. Quand ils sont actifs, ils expriment le CMH de classe II et des molécules de co-stimulation pour devenir CPA. Les lymphocytes B présentent des antigènes solubles qui se fixent aux immunoglobulines (Ig) de surface, les BCR. Ensuite, les antigènes sont internalisés par endocytose, puis complexés avec le CMH de classe II pour être exprimés à la surface des lymphocytes B.

- L'activation des lymphocytes T

Quand les lymphocytes T reconnaissent un antigène *via* le CMH présenté par les CPA, ils prolifèrent et migrent vers le site d'inflammation. Pour leur activation, 3 signaux interdépendants sont nécessaires (**Figure 3**). Le signal 1 spécifique de l'antigène est transduit par le complexe CD3 après interaction entre le récepteur TCR des cellules T avec le CMH de la CPA. Le signal 2 est un signal de co-stimulation régulé par l'interaction entre CD28 dans les cellules T et CD80/86 (B7.1/2) dans la CPA. Ce deuxième signal nécessaire pour l'activation complète des cellules T n'est pas spécifique de l'antigène et joue un rôle crucial dans l'activation lymphocytaire et la sélection du type de réponse (effectrice ou régulatrice) ou au contraire peut réguler négativement la réponse immunitaire. Ces deux signaux activent 3 voies de transduction: i) la voie de la calcineurine, calcium dépendante, qui active le facteur nucléaire des lymphocytes T activés (NFAT, de l'anglais, nuclear factor of activated T cells); ii) la voie RAS-MAPK, qui active la protéine activatrice 1 (AP-1, de l'anglais, activator protein 1); iii) la voie du facteur nucléaire stimulateur des chaînes légères kappa des cellules B activées (NF-κB, de l'anglais, nuclear factor-kappa B). Ces trois facteurs, NFAT, AP-1 et NF-κB, induisent l'expression de certaines cytokines comme l'IL-2, qui va se fixer à son

récepteur de haute affinité IL-2R (ou CD25) exprimé par la même cellule, initiant ainsi le signal 3 d'activation. Le récepteur IL-2R peut alors activer 2 voies de signalisation différentes: la voie phosphoinositide 3-kinase/protéine kinase B/ cible de la rapamycine chez les mammifères (PI3K/Akt/mTOR), et la voie JAK-STAT (de l'anglais, Janus-associated kinase-signal transducers and activators of transcription) et MAPK (de l'anglais, mitogen-activated protein kinases), qui régulent l'initiation du cycle cellulaire et la prolifération des lymphocytes T conduisant à l'expansion clonale [Halloran 2004, Legendre et al. 2007, Fernández-Ramos et al. 2016, Lim et al. 2017].

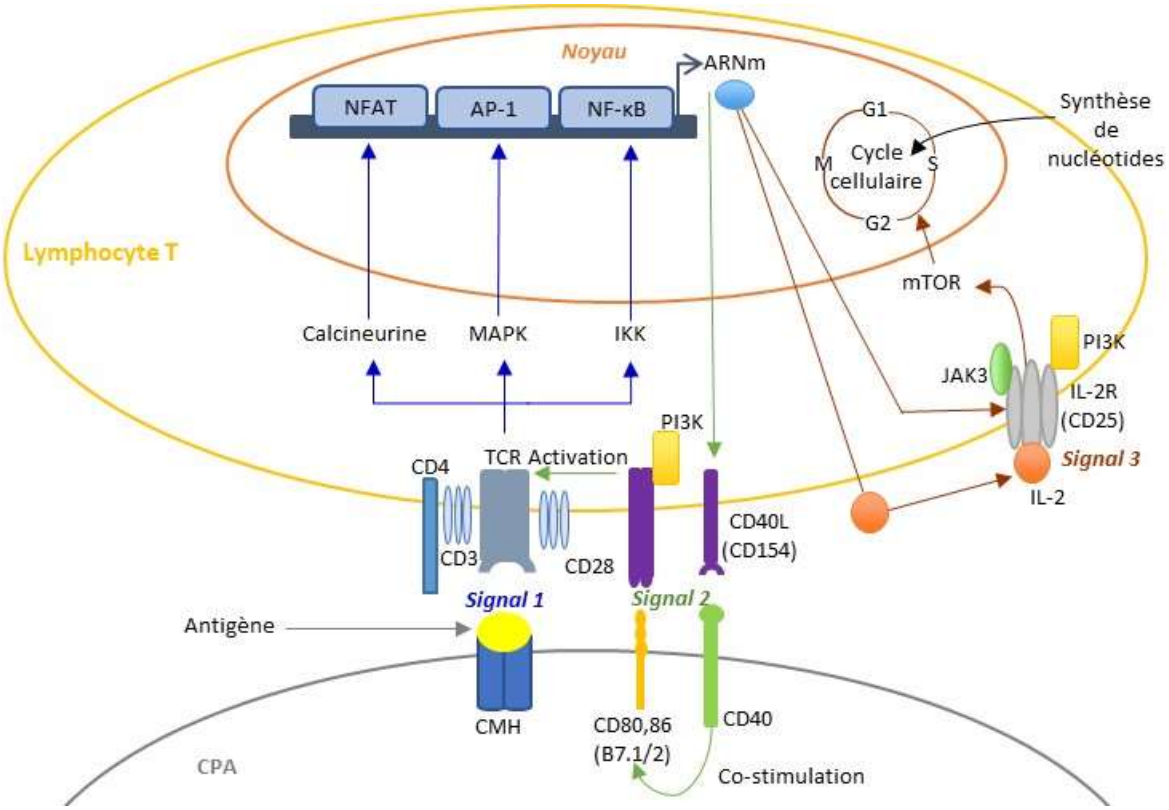


Figure 3. Voies d'activation des lymphocytes T.
Après la reconnaissance d'un antigène par le CMH présenté par les CPA, le signal d'activation 1 par le TCR se déclenche. Ensuite, 3 voies intracellulaires peuvent être activées: la calcineurine avec NFAT, les MAPK avec AP-1 et l'IKK avec NF-κB. Cela permet l'expression des récepteurs de co-stimulation comme CD40L nécessaire à une activation complète des lymphocytes. Les signaux 1 et 2 permettent la synthèse d'IL-2, qui est sécrétée et se fixe sur son récepteur l'IL-2R de manière autocrine pour activer le signal 3 pour la prolifération cellulaire *via* mTOR et la progression du cycle cellulaire. AP-1: protéine activatrice 1; ARNm: acide ribonucléique messager; CD28: cluster de différenciation 28; CD3: cluster de différenciation 3; CD4: cluster de différenciation 4; CD40: cluster de différenciation 40; CD40L: ligand de CD40 ou CD154; CD80/86: cluster de différenciation 80/86; CMH: complexe majeur d'histocompatibilité; CPA: cellule présentatrice d'antigène; IKK: kinase IKB; IL2: interleukine 2; IL2R : récepteur d'IL2; JAK3: janus kinase 3; M: mitose; MAPK: mitogen-activated protein kinases; mTOR: cible de la rapamycine chez les mammifères; NFAT: facteur nucléaire des lymphocytes T actives; NF-κB: nuclear factor-kappa B; PI3K: phosphoinositide 3-kinase; TCR: récepteur des cellules T. Modifiée de [Fernández-Ramos et al. 2016].

- Classification des lymphocytes T

Il existe plusieurs types de lymphocytes T effecteurs: T auxiliaires (Th); T cytotoxiques (Tc); T régulateurs (Tregs); T mémoire et les cellules T NK. Nous nous focaliserons sur les lymphocytes T CD4$^+$ *helper* et régulateurs et sur les lymphocytes T CD8$^+$ cytotoxiques en lien avec le projet de thèse.

- Les lymphocytes CD4$^+$

Les lymphocytes T CD4$^+$ sont classés principalement en Th ou Tregs. Les lymphocytes T naïfs (Th0) sont les précurseurs lymphocytaires immatures qui peuvent devenir Th1, Th2, Th17 ou Tregs selon le contexte inflammatoire. Chaque sous-type se différencie selon l'environnement inflammatoire et possède des fonctions spécifiques car ces cellules produisent des cytokines différentes (**Figure 4**) [Burkholder et al. 2014].

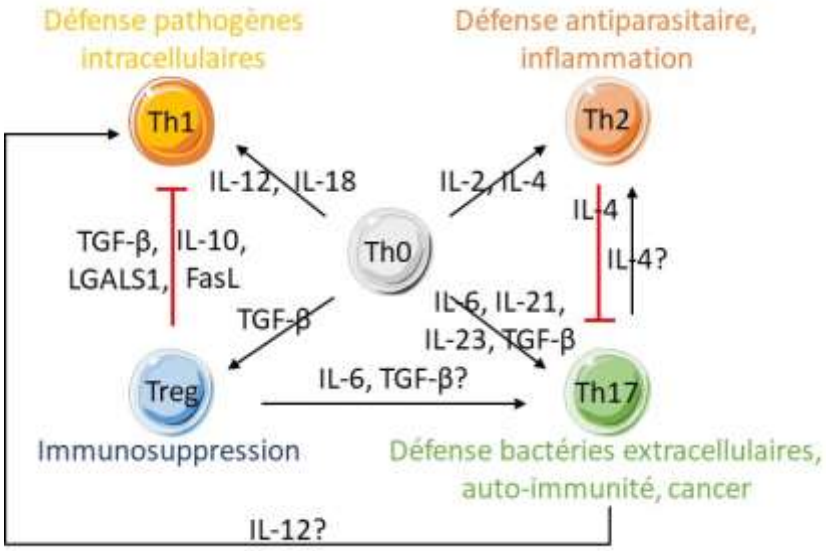


Figure 4. Différenciation des lymphocytes T CD4$^+$ selon le contexte des cytokines.
Les cellules immatures Th0 se différencient en Th1, Th2, Th17 ou Treg en fonction d'un microenvironnement cytokinique spécifique. Modifiée de: [Matricon 2010, Burkholder et al. 2014, CDU-HGE 2014]

- *Les cellules T helper*

Les Th CD4$^+$ orchestrent la réponse immunitaire par reconnaissance de l'antigène du non soi et contrôlent l'activation d'autres constituants de la réponse immunitaire cellulaire. Elles sont aussi impliquées dans l'activation des lymphocytes B.

Les cellules Th1 produisent l'IL-2 qui induit la prolifération des lymphocytes T et stimule la division et la cytotoxicité des lymphocytes T CD8$^+$. Les Th1 produisent également l'interféron gamma (IFNγ) qui active les cellules NK et les macrophages pour éliminer les agents pathogènes intracellulaires. Il existe une boucle de rétroactivation positive car l'IFNγ va stimuler la

différenciation des Th0 en Th1 et va ainsi inhiber leur différenciation en Th2 [Parkin and Cohen 2001, Rye et al. 2016]. Les cellules Th2 produisent l'IL-4, 5, 6 et 10 favorisant la production d'anticorps. Par exemple, l'IL-4 active les lymphocytes B en provoquant leur différenciation en plasmocytes et induit une boucle de rétroactivation en favorisant la différenciation des Th0 en Th2 [Parkin and Cohen 2001, Rye et al. 2016]. En conséquence, les Th1 sont associés à une immunité cellulaire, tandis que les Th2 sont associés à une immunité humorale.

Les Th17 sécrètent l'IL-6, les IL-17A et IL-17F et l'hétérodimère IL-17A/F, avec un pouvoir pro-inflammatoire puissant pouvant induire le recrutement des neutrophiles. Les Th17 se différencient en présence d'IL-6, de TGF-β et d'IL-23. Elles jouent un rôle dans la réponse aux infections bactériennes extracellulaires et fongiques [CDU-HGE 2014]. Elles sont aussi impliquées dans certaines maladies auto-immunes et dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) [Kotake et al. 1999, Fujino et al. 2003, Wolk et al. 2006, Tzartos et al. 2008, CDU-HGE 2014].

- *Les lymphocytes Tregs*

Les Tregs représentent 10% des lymphocytes T $CD4^+$ et leur rôle principal est le maintien de l'homéostasie et de l'auto-tolérance immunitaire [Sakaguchi et al. 2008, Wing and Sakaguchi 2010]. Les Tregs existent sous deux types, les «naturels», présents dans le thymus, dès la 13ème semaine après la naissance chez l'Homme, et les «inductibles» situés en périphérie et qui proviennent de la différenciation des lymphocytes Th0 induite par le facteur de croissance transformant β (TGF-β) [Ehrenstein et al. 2004, Miyara et al. 2005]. Ils diminuent l'expression des molécules de co-stimulation à la surface des CPA, ce qui a pour conséquence d'inhiber l'activation des lymphocytes T effecteurs $CD4^+$ et $CD8^+$. Il y a une augmentation de la différenciation des Th0 en Tregs car ils inhibent la différenciation des Th0 en Th1 [Grossman et al. 2004]. Une diminution des lymphocytes Tregs aurait un impact positif sur la prolifération des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$. Par conséquent, les Tregs constituent une cible thérapeutique intéressante pour induire une immunosuppression.

Les Tregs expriment à leur surface le CD4 ainsi que le CD25, mais sont identifiés de façon plus spécifique par l'expression du facteur transcriptionnel FOXP3 (de l'anglais, Forkhead box P3) dont l'expression est nécessaire et suffisante pour la différenciation en Tregs. Les Tregs naturels expriment le facteur de transcription FOXP3 dont le niveau et la stabilité d'expression corrèlent avec leur fonction suppressive. Des mutations du gène *FOXP3* aboutissant à sa perte de fonction entraînent chez l'homme le syndrome IPEX (de l'anglais, Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, autoimmune Enteropathy X-linked) [Fontenot et al. 2003].

Les Tregs régulent l'homéostasie des cellules T en sécrétant des cytokines dont l'IL-10 et le TGF-β qui se lient à des récepteurs à la surface de lymphocytes T activés et diminuent leur activité. Les Tregs sont impliqués dans le contrôle de l'auto-immunité et ont un rôle important dans le maintien de la tolérance fœtale et l'établissement dans la tolérance fœto-maternelle. Les Tregs interviennent dans la tolérance après transplantation d'organes, en prévenant les réactions du

greffon contre l'hôte, l'allergie et l'hypersensibilité. Ces cellules vont également réduire l'immunité anti-tumorale et au cours des infections [Wood and Sakaguchi 2003].

- Les lymphocytes T cytotoxiques $CD8^+$

Les lymphocytes $CD8^+$ cytotoxiques ont un rôle primordial dans l'activité antivirale et anti-tumorale. En effet, ils sont essentiels dans la protection contre les infections intracellulaires et les cancers [Williams and Bevan 2007].

Après fixation, les lymphocytes cytotoxiques $CD8^+$ insèrent des perforines dans la membrane de la cellule cible afin de la lyser et d'induire l'apoptose [Parkin and Cohen 2001, Rye et al. 2016]. De plus, ils sécrètent des cytokines pour amplifier la réponse immunitaire [Rye et al. 2016].

I.1.3. Les lymphocytes B

Les lymphocytes B matures naïfs se trouvent en périphérie et agissent selon deux mécanismes: dépendant ou indépendant des lymphocytes T. Dans le premier cas, les lymphocytes B capturent l'antigène pour l'exprimer dans le CMH de classe II qui pourrait être reconnu par les Th2, induisant la différenciation des cellules B en plasmocytes, puis la sécrétion d'anticorps (**Figure 1**). Cela a lieu principalement dans les centres germinaux des nodules lymphoïdes [Parkin and Cohen 2001, Rye et al. 2016]. Dans le deuxième cas, les lymphocytes B peuvent aussi sécréter des anticorps sans la fixation aux Th2, simplement par fixation directe aux antigènes [Parkin and Cohen 2001].

Une des fonctions des lymphocytes B est de produire des anticorps. Cependant, dans des étapes plus précoces, grâce aux BCR, ils agissent comme des cellules présentatrices d'antigène pour les lymphocytes T [Parkin and Cohen 2001].

Les lymphocytes B se développent dans la moelle osseuse. Les lymphocytes B immatures expriment des récepteurs BCR à la surface qui sont soumis à une sélection négative (tolérance centrale). Si les lymphocytes B immatures réagissent avec des auto-antigènes présents dans la moelle osseuse, plusieurs mécanismes peuvent se déclencher. Dans le cas où l'affinité est faible à très forte, les lymphocytes B vont éditer à nouveau une partie du récepteur BCR et l'auto-réactivité sera testée à nouveau. Le mécanisme correctif des récepteurs requiert les gènes RAG1 et RAG2 (de l'anglais, recombination-activating gene 1 and 2) qui sont surexprimés et permettent le réarrangement des gènes du récepteur BCR. A l'inverse, les lymphocytes B qui possèdent des récepteurs BCR avec une très faible auto-réactivité seront sélectionnés par ignorance ou anergie. Une proportion très faible de lymphocytes B auto-réactifs vont être éliminés par délétion clonale [Goodnow et al. 2005, Kindt et al. 2007a, Pelanda and Torres 2012]. Les cellules B immatures qui ont été triées par la voie de la sélection négative vont continuer à se différencier pour migrer ensuite vers la rate [Pelanda and Torres 2012].

II. La reprogrammation métabolique

II.1. Introduction

Le métabolisme cellulaire est un réseau complexe de réactions biochimiques nécessaires pour la production d'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) et la biosynthèse de macromolécules [Palsson-McDermott and O'Neill 2013, Pearce et al. 2013]. La reprogrammation métabolique permet à la cellule de s'adapter aux conditions extracellulaires et intracellulaires qui changent au cours du temps et de la localisation. Toutes les altérations du métabolisme sont susceptibles de modifier le phénotype, la fonction, la prolifération et la viabilité cellulaire.

La reprogrammation métabolique est un mécanisme adaptatif qui peut affecter presque toutes les voies métaboliques afin de permettre à la cellule de proliférer et de survivre dans les nouvelles conditions de l'environnement. Plus spécifiquement, la biosynthèse de nucléotides prend une part importante dans la reprogrammation métabolique puisqu'elle représente un prérequis essentiel pour la croissance et la prolifération cellulaire.

Durant des décennies, les voies métaboliques et de signalisation ont été étudiées séparément. Actuellement, les liens entre ces voies sont très étudiés pour mieux comprendre leurs interconnexions et le fonctionnement cellulaire. Plus récemment, la connaissance des bases moléculaires régulant la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses mais aussi celle des cellules du système immunitaire, principalement les lymphocytes T, a considérablement progressé, bien que les voies biochimiques fondamentales impliquées dans ces processus aient été décrites depuis longtemps.

Dans un premier temps, nous décrirons la reprogrammation métabolique dans les cellules cancéreuses, en nous focalisant sur les voies métaboliques impliquées et sa régulation par les «checkpoints» métaboliques. Ensuite, nous exposerons les données actuellement connues sur la reprogrammation métabolique dans les lymphocytes T, en soulignant l'importance des «checkpoints» métaboliques sur la différenciation et l'activation lymphocytaire.

II.2. Reprogrammation métabolique: redécouverte de la biochimie élémentaire dans les cellules qui prolifèrent

En présence d'oxygène, les cellules qui ne prolifèrent pas (dans des tissus différenciés) métabolisent le glucose en CO_2 par l'intermédiaire du cycle de Krebs, conduisant à la production des formes réduites de nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et de flavine adénine

dinucléotide ($FADH_2$) associée à une production minimale de lactate [Vander-Heiden et al. 2009, Palsson-McDermott and O'Neill 2013, Pearce and Pearce 2013]. La production maximale d'ATP (36 molécules d'ATP par molécule de glucose) est effective quand elle fait intervenir la phosphorylation oxydative (OXPHOS, de l'anglais, oxidative phosphorylation), couplée avec le cycle de Krebs [Gatenby and Gillies 2004, Vander-Heiden et al. 2009, Palsson-McDermott and O'Neill 2013, Tarrado-Castellarnau et al. 2016]. Dans cette situation, la présence d'oxygène inhibe la glycolyse dans les cellules qui ne prolifèrent pas *via* le mécanisme nommé «effet Pasteur» [Racker 1974, Gatenby and Gillies 2004, Porporato et al. 2011]. Dans des conditions d'hypoxie (niveau d'O_2 faible), le glucose est dégradé en pyruvate *via* la glycolyse anaérobie (car il n'y a pas d'oxygène) puis en lactate, avec production seulement de 2 molécules d'ATP par molécule de glucose [Vander-Heiden et al. 2009, Palsson-McDermott and O'Neill 2013] (**Figure 5**).

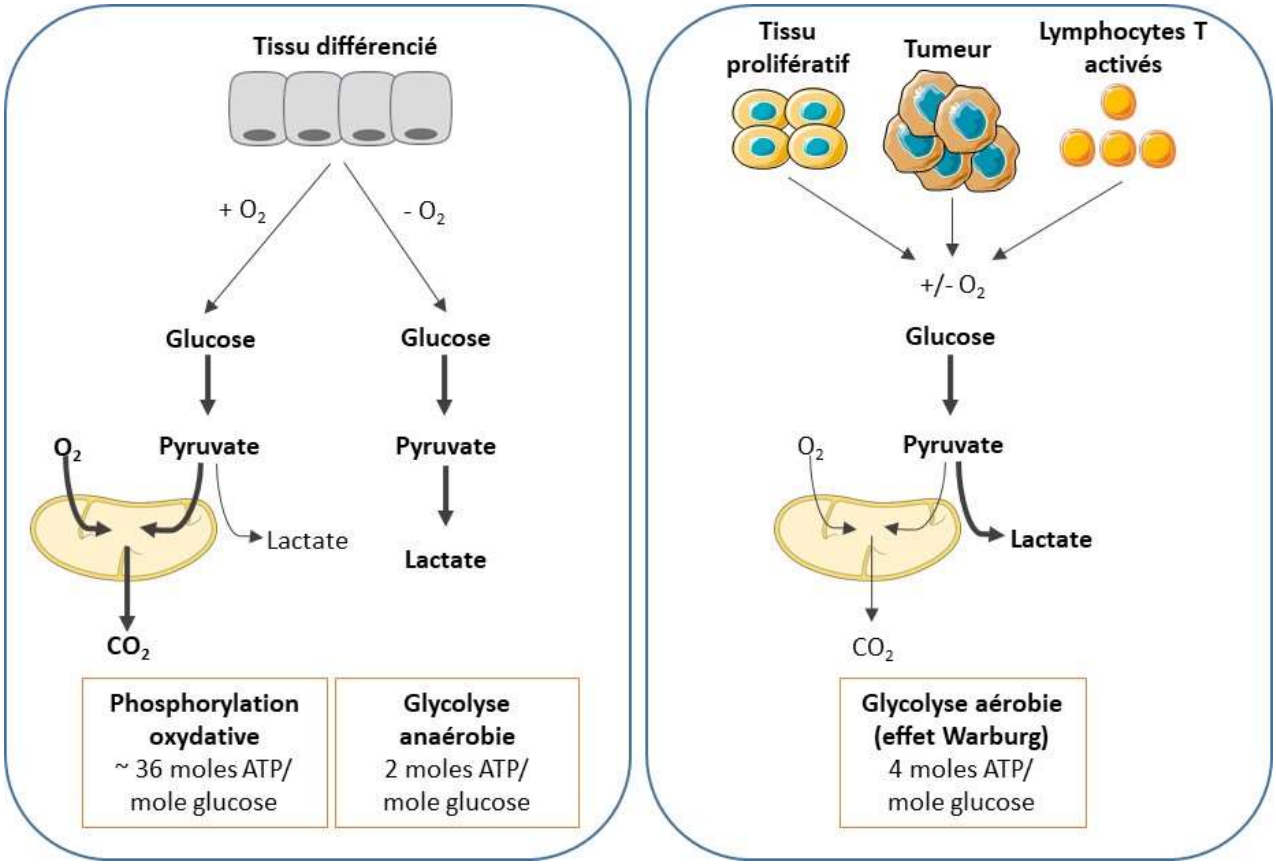


Figure 5. Représentation schématique du métabolisme glycolytique selon les différents types cellulaires.

Dans les tissus différenciés, en présence d'oxygène le glucose est oxydé en pyruvate qui entre dans la mitochondrie pour suivre le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative, avec production de 36 moles d'ATP par mole de glucose. Par contre, en absence d'oxygène, le glucose est oxydé en pyruvate puis en lactate avec seulement 2 moles d'ATP par mole de glucose. Dans les tissus prolifératifs, les cellules tumorales et les lymphocytes T activés, indépendamment de l'oxygène, la plupart du glucose va être métabolisé en lactate et un faible pourcentage va suivre la voie du cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative avec une production de 4 moles d'ATP par mole de glucose. Modifiée de: [Vander-Heiden et al. 2009]

Les cellules qui prolifèrent, comme les cellules cancéreuses et les lymphocytes T activés, réalisent la glycolyse aérobie, nommée «effet Warburg». Dans ce cas, le glucose est métabolisé préférentiellement en pyruvate, lui-même réduit en lactate plutôt que d'être orienté vers la mitochondrie pour servir de substrat pour le cycle de Krebs et l'OXPHOS. Cette voie est moins efficace énergétiquement et peut causer une acidose micro-environnementale par la présence d'acide lactique extracellulaire, ce qui favorise la prolifération [Gatenby and Gillies 2004, Vander-Heiden et al. 2009, Macintyre and Rathmell 2013].

En 1924, Otto Warburg avait décrit le changement du métabolisme dans les cellules cancéreuses. Il avait observé que la croissance et la prolifération des cellules cancéreuses étaient très dépendantes du glucose et de la glutamine [Warburg 1956, Macintyre and Rathmell 2013]. Il avait fait l'hypothèse qu'il existait un dysfonctionnement mitochondrial dans ces cellules anormales. Actuellement, on sait que les cellules cancéreuses n'ont pas un dérèglement fonctionnel de la mitochondrie, mais que cette réorientation du métabolisme permet la synthèse de macromolécules pour pouvoir s'adapter aux besoins de croissance et de prolifération.

Le changement du métabolisme vers un mode de production d'ATP énergétiquement moins efficace semble contradictoire, puisque la génération d'énergie est 18 fois inférieure à l'OXPHOS. En réalité, la glycolyse aérobie favorise la prolifération cellulaire rapide par: i) un flux de production d'ATP rapide (pendant qu'une molécule de glucose est oxydée par l'OXPHOS, 12 sont consommées par la glycolyse aérobie); ii) un approvisionnement en métabolites intermédiaires (pour la synthèse des acides aminés, lipides et nucléotides) nécessaires pour la prolifération et la croissance; iii) une adaptation à l'environnement car la glycolyse aérobie est associée à la résistance à l'apoptose et permet la survie cellulaire et la prolifération dans des conditions d'hypoxie [Vander-Heiden et al. 2009, Mason et al. 2010, Porporato et al. 2011, Macintyre and Rathmell 2013, Song et al. 2016].

II.2.1. Données générales sur le métabolisme des cellules cancéreuses

Dans cette partie, nous résumons le métabolisme du glucose, de la glutamine et des lipides, reconnus comme les plus importants pour la croissance et la prolifération des cellules cancéreuses (**Tableau 1**).

Voies métaboliques	Description	Substrats	Composants principaux
Glycolyse	• Catabolisme des sucres en 6C en deux molécules de pyruvate • Pyruvate en lactate ou vers le cycle de Krebs	Glucose	GLUT1, GLUT3, HK2, PPK1, PK, LDHA, PDK1
Cycle de Krebs	• Réactions chimiques catalysées par des enzymes avec réduction de NAD^+, qui peut être substrat pour la chaîne respiratoire de l'OXPHOS	Acétyl-CoA (synthétisé du glucose, lipides et acides aminés)	PDH, CS, α-KGDH
OXPHOS	• Oxydation des intermédiaires par la chaîne respiratoire qui produit un gradient de protons à travers la membrane interne de la mitochondrie, avec production d'ATP	NADH $FADH_2$	Oxygène
Oxydation des acides gras	• Catabolisme des acides gras en acétyl-CoA • L'acétyl-CoA peut rentrer dans le cycle de Krebs puis l'OXPHOS	Acides gras	CPT1A
Glutaminolyse	• Catabolisme de la glutamine pour production d'énergie • Production de pyruvate ou des intermédiaires du cycle de Krebs	Glutamine	CD98 ou LAT1, GLS, α-KGDH
Synthèse des acides gras	• Anabolisme pour la génération des acides gras à partir des précurseurs de l'acétyl-CoA et du malonyl-CoA	Acétyl-CoA Manolyl-CoA	ACC1 SREBPs

Tableau 1. Synthèse des voies métaboliques.
La glycolyse, le cycle de Krebs, l'OXPHOS, l'oxydation des acides gras, la glutaminolyse et la synthèse des acides gras sont les voies principales du métabolisme. Leurs substrats spécifiques avec les transporteurs ou enzymes clés pour son fonctionnement sont présentés dans le tableau. ACC1: acétyl-CoA carboxylase 1; CD98: échangeur hétérodimérique comprenant SLC3A2 et SLC7A5; CPT1A: carnitine palmitoyl-transférase 1A; CS: citrate synthétase; $FADH_2$: flavine adénine dinucléotide; GLUT1: transporteur du glucose 1 ou SLC2A1, solute carrier family 2 member 1; GLUT3: transporteur du glucose 3 ou SLC2A3, solute carrier family 2 member 3; GLUT4: transporteur du glucose 4 ou SLC2A4, solute carrier family 2 member 4; HK2: héxokinase de type 2; LDHA: lactate déshydrogénase A; NADH: nicotinamide adénine dinucléotide (réduite); OXPHOS: phosphorylation oxydative; PDK1: pyruvate déshydrogénase kinase 1; PFK1: phosphofructokinase 1; PK: pyruvate kinase; PPK1: polyphosphate kinase; SREBPS: sterol regulatory element-binding protein 1; α-KGDH: α-cétoglutarate déshydrogénase. Adapté de: [Pollizzi and Powell 2014].

- Le métabolisme du glucose

Le glucose entre dans la cellule grâce à des transporteurs et il est catabolisé après plusieurs étapes en pyruvate (1 molécule de glucose donne 2 molécules de pyruvate) (**Figure 6**). Le pyruvate peut ensuite être, soit transformé en lactate, soit orienté vers le cycle de Krebs. Le pyruvate est transformé en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH) dans le cytosol et exporté hors de la cellule. Cela permet seulement la production de deux molécules d'ATP mais aussi la régénération du NAD^+ (oxydé), nécessaire au déroulement de la glycolyse [Porporato et al. 2011, Palsson-McDermott and O'Neill 2013]. Le pyruvate peut également pénétrer dans la mitochondrie pour être décarboxylé par la pyruvate déshydrogénase (PDH) en acétyl-CoA, permettant ainsi l'entrée dans le cycle de Krebs. Le cycle de Krebs génère les coenzymes réduits NADH et $FADH_2$, pour fournir à la chaîne respiratoire les électrons nécessaires pour produire l'énergie, mais aussi du CO_2

[Palsson-McDermott and O'Neill 2013, Phan et al. 2014]. Ensuite, l'OXPHOS, qui utilise des intermédiaires produits au cours du cycle de Krebs, est le mécanisme le plus efficace pour la synthèse d'ATP, car pour chaque molécule de glucose, 36 molécules d'ATP sont produites. Le NADH et le $FADH_2$ sont oxydés le long de la chaîne respiratoire qui est une chaîne de transport d'électrons, localisée dans la membrane interne de la mitochondrie, constituée de 4 complexes protéiques (I à IV) qui vont réduire une molécule d'oxygène en eau. La circulation d'électrons génère un gradient de concentration de protons dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie, utilisé par l'adénosine triphosphatase (ATPase, complexe V) pour phosphoryler l'ADP et produire l'ATP [Tarrado-Castellarnau et al. 2016].

Les cellules cancéreuses ont un flux glycolytique entre 2 et 17 fois supérieur à celui des cellules normales [Rodríguez-Enríquez et al. 2009]. Cette augmentation est en partie la conséquence d'une augmentation de l'expression des enzymes de la glycolyse et des transporteurs du glucose. Par exemple, les transporteurs du glucose 1 (GLUT1 ou SLC2A1, solute carrier family 2 member 1) et 3 (GLUT3 ou SLC2A3, solute carrier family 2 member 3), qui ont une très grande affinité pour le glucose, assurent l'entrée du glucose dans la cellule. Une surexpression de GLUT1 et GLUT3 est associée à un mauvais pronostic dans différents cancers [Porporato et al. 2011]. La deuxième étape limitante est régulée par l'enzyme hexokinase 2 (HK2) qui phosphoryle le glucose en glucose-6-phosphate (G6P) et empêche sa sortie de la cellule et favorise son flux vers la glycolyse ou la voie des pentoses phosphates. De manière intéressante, HK2 est surexprimée dans différents types de cancers avec mauvais pronostic possiblement en lien avec son action protectrice vis-à-vis de l'apoptose en favorisant la glycolyse [Porporato et al. 2011]. Le G6P est transformé en fructose-6-phosphate (F6P). Ensuite, la phosphofructokinase-1 (PFK1), enzyme importante en terme de régulation de la glycolyse, métabolise le F6P en fructose 1,6-biphosphate (F1,6-BP). La PFK1 est inhibée par l'ATP et activée par le fructose 2,6-biphosphate (F2,6BP), produit à partir du F6P par la 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase isoforme 3 (PFKFB3) [Macintyre and Rathmell 2013]. L'autre étape clé de la glycolyse est la production du pyruvate à partir du phosphoénolpyruvate (PEP) par la pyruvate kinase 2 (PKM2). Le niveau d'expression de PKM2 qui permet l'activation des voies anaboliques et de la croissance cellulaire est augmenté dans les cellules qui prolifèrent [Porporato et al. 2011, Pearce et al. 2013]. Deux intermédiaires de la glycolyse, le G6P et le 3-phosphoglycérate peuvent être utilisés respectivement comme substrats dans la voie des pentoses phosphates ou de la biosynthèse de sérine, qui sont des précurseurs pour la synthèse de nucléotides et d'acides aminés [Buck et al. 2015].

Le pyruvate issu de la glycolyse est transporté activement du cytosol vers la matrice mitochondriale où il sera transformé en acétyl-CoA. Bien que les cellules en prolifération présentent un ralentissement du métabolisme mitochondrial (cycle de Krebs et OXPHOS), certains intermédiaires du cycle de Krebs continuent de jouer un rôle important. Par exemple, la concentration de succinate est élevée dans certaines cellules cancéreuses, ce qui entraîne l'inhibition des prolyl-hydroxylases (PHD). Ces enzymes génèrent du succinate à partir de l'α-

cétoglutarate, un inhibiteur des PHD, avec comme conséquence une stabilisation du facteur inductible par l'hypoxie 1 α (HIF-1α, de l'anglais, hypoxia-inducible factor 1-α) [Palsson-McDermott and O'Neill 2013]. De plus, les intermédiaires du cycle de Krebs sont utilisés pour la synthèse de lipides, du cholestérol, des acides aminés et d'autres métabolites essentiels. Un déficit complet du métabolisme mitochondrial et de la biogénèse aurait pour conséquence un arrêt de la prolifération et de la croissance tumorale [Phan et al. 2014, Tarrado-Castellarnau et al. 2016].

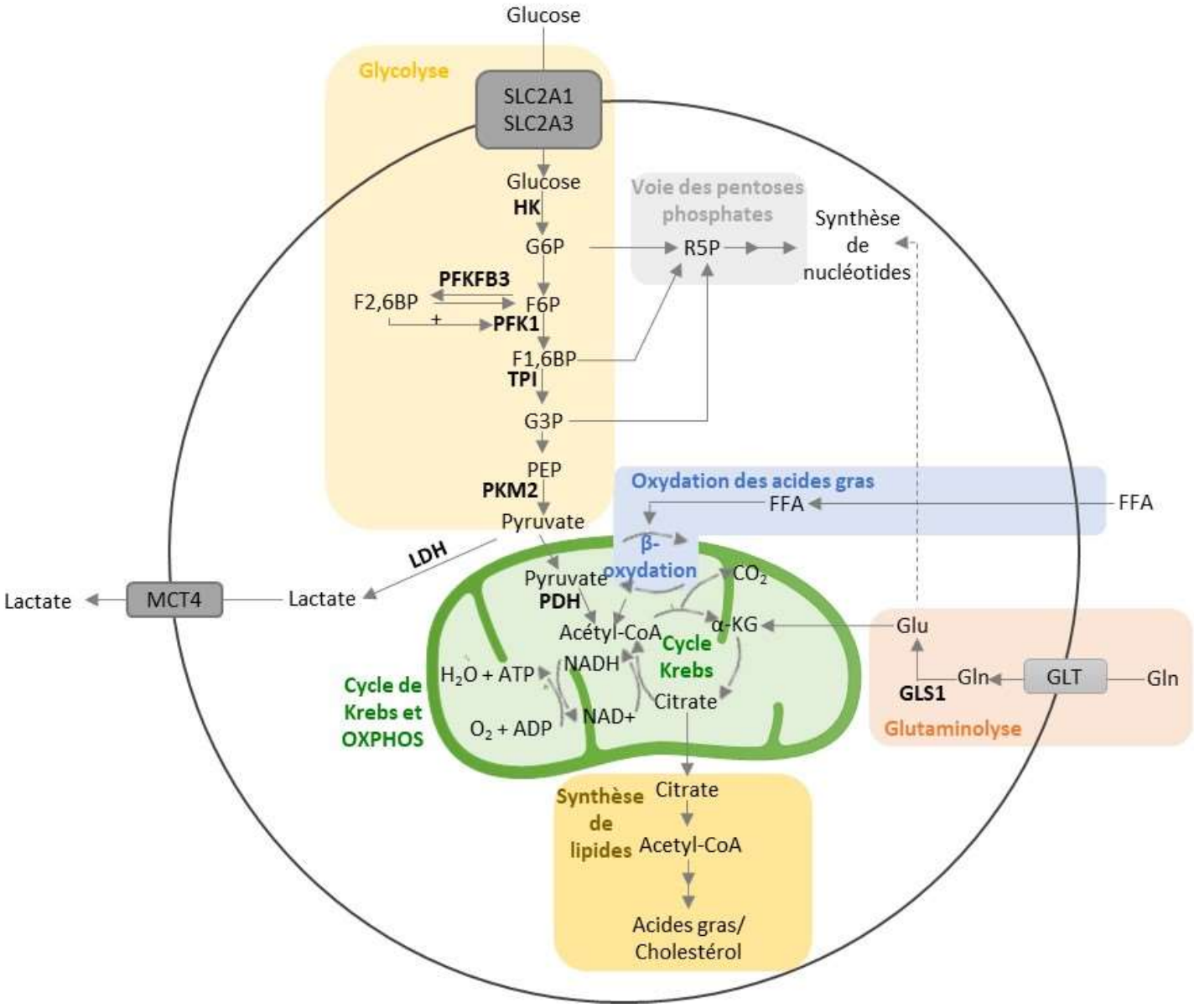


Figure 6. Représentation simplifiée des voies du métabolisme.
Au cours de la glycolyse, le glucose est oxydé en pyruvate, qui peut être converti en lactate puis excrété à l'extérieur de la cellule, ou entrer dans la mitochondrie. Dans la mitochondrie, le pyruvate est converti en acétyl-CoA qui rentre dans le cycle de Krebs couplé à la phosphorylation oxydative. La β-oxydation des acides gras produit aussi de l'acétyl-CoA pour alimenter le cycle de Krebs. Le citrate, un intermédiaire du cycle de Krebs peut sortir du cytoplasme pour être transformé en acétyl-CoA pour produire des acides gras et du

cholestérol. La glutaminolyse facilite le transport de la glutamine à l'intérieur de la cellule où elle est convertie en glutamate qui peut être transformé en α-cétoglutarate dans la mitochondrie ou être utilisé comme précurseur dans la synthèse de nucléotides. La voie des pentoses phosphates utilise des intermédiaires de la glycolyse comme le G6P, le F1,6-BP ou le G3P pour former le R5P, un précurseur de la synthèse de nucléotides. Acétyl-CoA: acétyl coenzyme A; ADP: adenosine diphosphate; ATP: adenosine triphosphate; F1,6BP: fructose-1,6-biphosphate; F2,6BP: fructose-2,6-biphosphate; F6P: fructose 6-phosphate; FFAs: acides gras libres; G3P: glycéraldéhyde-3-phosphate; G6P: glucose-6-phosphate; Gln: glutamine; GLS1: glutaminase type 1; GLT: transporteur de glutamine; Glu: acide glutamique; HK: hexokinase; LDH: lactate déhydrogénase; MCT4: monocarboxylate transporter 4; NADH/NAD+: nicotinamide adénine dinucléotide; OXPHOS: phosphorylation oxydative; PDH: pyruvate déshydrogénase; PEP: phosphoénolpyruvate; PFK1: phosphofructokinase-1; PFKFB3: 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase isoform 3; PKM2: pyruvate kinase muscle isoform 2; R5P: ribose-5-phosphate; SLC2A1: solute carrier family 2 member 1; SLC2A3: solute carrier family 2 member 3; TPI: triose-phosphate isomérase; α-KG: alpha-cétoglutarate. Modifiée de: [Fernández-Ramos et al. 2016]

- Le métabolisme de la glutamine

La glutaminolyse représente la voie du catabolisme de la glutamine (**Figure 6**). La glutamine, acide aminé non essentiel le plus abondant dans le plasma, est captée par la cellule grâce à des transporteurs. Elle joue un rôle essentiel dans la synthèse des nucléotides et des acides aminés non essentiels et permet la synthèse d'acétyl-CoA qui est un précurseur des acides gras. L'étape initiale du catabolisme intracellulaire de la glutamine est la conversion de la glutamine en glutamate par des enzymes appelées glutaminases (GLS). Il existe plusieurs voies de dégradation de la glutamine. La voie de la glutaminolyse canonique permet l'entrée de la glutamine dans le cycle de Krebs et la production d'ATP. En effet, le glutamate peut être transformé dans la mitochondrie en α-cétoglutarate, intermédiaire du cycle de Krebs. La deuxième voie, ou glutaminolyse biosynthétique, va fournir une quantité importante d'azote et de carbone nécessaire à la synthèse des purines et des pyrimidines et également pour la synthèse d'acides aminés non-essentiels [Daye and Wellen 2012, Macintyre and Rathmell 2013, Yang et al. 2014]. Le glutamate peut être utilisé pour la synthèse de lipides par réduction carboxylative [Macintyre and Rathmell 2013]. Dans les cellules en prolifération, le citrate du cycle de Krebs est exporté vers le cytoplasme pour générer l'acétyl-CoA, un précurseur de la synthèse des lipides. En raison de la consommation continue de citrate, le réapprovisionnement des intermédiaires du cycle de Krebs est nécessaire, et la glutamine est un précurseur important [Daye and Wellen 2012].

En plus de son rôle comme source de carbone pour la production d'énergie et de donneur de carbone et d'azote pour les réactions de synthèse, la glutamine régule l'homéostasie redox pour régénérer les défenses anti-oxydantes et former du glutathion grâce à la production de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) [Daye and Wellen 2012, Tarrado-Castellarnau et al. 2016].

- Le métabolisme des lipides

Les cellules cancéreuses qui prolifèrent ont une augmentation de la synthèse des lipides et du cholestérol pour permettre la formation de nouvelles organelles et autres membranes cellulaires (**Figure 6**) [Beloribi-Djefaflia et al. 2016, Tarrado-Castellarnau et al. 2016]. L'acétyl-CoA est le substrat essentiel de la biosynthèse des acides gras. Il est formé à partir du pyruvate ou du catabolisme des acides aminés ou par la dégradation du citrate qui provient du cycle de Krebs. Le citrate est issu de la dégradation du glucose ou de la glutamine notamment dans les cellules qui prolifèrent [DeBerardinis et al. 2008]. L'acétyl-CoA carboxylase (ACC) catabolise la première réaction de synthèse d'acides gras à partir d'acétyl-CoA et d'une molécule d'ATP pour former le malonyl-CoA, un inhibiteur naturel de la CPT1A (carnitine palmitoyl-transférase 1A), enzyme clé dans la β-oxydation des acides gras. Toutes les activités enzymatiques nécessaires à la biosynthèse des acides gras sont regroupées au sein d'une même chaîne peptidique qui constitue donc une protéine multi-enzymatique géante: l'acide gras synthase (FAS, de l'anglais, fatty acid synthase) [Phan et al. 2014]. De plus, la synthèse du cholestérol ou la voie du mévalonate jouent un rôle important dans la reprogrammation métabolique puisque le cholestérol est un composant majeur des membranes cellulaires [Phan et al. 2014].

La β-oxydation des acides gras permet leur dégradation apportant le NADH et le $FADH_2$ nécessaires à l'OXPHOS pour produire de l'ATP. Il faut également souligner que l'oxydation des acides gras est un processus hautement énergétique puisqu'elle peut produire deux fois plus d'ATP que la voie de dégradation des carbohydrates. Les acides gras peuvent être oxydés produisant de l'acétyl-CoA, du NADH et du $FADH_2$ à chaque cycle. Enfin, l'acétyl-CoA peut entrer dans le cycle de Krebs pour favoriser la synthèse de citrate ou pour produire davantage de NADH et de $FADH_2$, nécessaires pour la production d'ATP *via* la chaîne respiratoire [Phan et al. 2014].

II.2.2. La synthèse des nucléotides

Les nucléotides puriques et pyrimidiques sont des composants de l'ADN et de l'ARN et sont également impliqués dans la glycosylation de protéines et la biosynthèse de lipides membranaires. Dans les cellules cancéreuses tout comme dans les lymphocytes T activés, il y a une augmentation du pool des purines (2 fois) et des pyrimidines (8 fois) pour permettre la division cellulaire rapide [Quéméneur et al. 2003]. Les purines et les pyrimidines sont synthétisées par la voie de synthèse *de novo* ou de sauvetage.

- La voie des pentoses phosphates

Le glucose intracellulaire est métabolisé par l'HK en G6P. Ensuite, le G6P peut suivre la glycolyse et être transformé en pyruvate ou être redirigé par la voie des pentoses phosphates pour la production du ribose-5-phosphate (R5P), comme donneur de carbone pour la synthèse *de novo* de nucléotides [Tong et al. 2009, Macintyre and Rathmell 2013, Jiang et al. 2014]. Le R5P est produit à partir du G6P par la branche oxydative de la voie des pentoses phosphates ou à partir du F6P ou

glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) par la branche non oxydative [Tong et al. 2009] (**Figure 6**). La branche oxydative est régulée par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), l'enzyme limitante qui catalyse une étape irréversible avec production de NADPH [Tong et al. 2009, Stanton 2012, Jiang et al. 2014, Phan et al. 2014]. La production de NADPH est essentielle pour la biosynthèse des acides gras, du cholestérol et pour la formation du glutathion [Jiang et al. 2014, Phan et al. 2014]. Seule la partie oxydative est régulée et sa vitesse dépend de la quantité de $NADP^+$ disponible dans le cytoplasme. La branche non-oxydative, réversible, couple la voie des pentoses phosphates avec la glycolyse. Elle est réalisée par la transkétolase (TKT) et la transaldolase par échange de carbone entre le R5P de la voie des pentoses phosphates et le G3P et le F6P de la glycolyse [Jiang et al. 2014, Phan et al. 2014].

La voie des pentoses phosphates est critique pour la prolifération cellulaire aussi bien pour les cellules cancéreuses que pour les lymphocytes T parce qu'elle fournit du NADPH, du R5P et d'autres métabolites essentiels [Phan et al. 2014]. Les cellules en division rapide nécessitant de NADPH, les substrats de la glycolyse seront privilégiés pour produire du R5P.

La capacité proliférative d'une cellule dépend du pool de nucléotides générés principalement par la voie des pentoses phosphates et de l'activité des enzymes limitantes responsables de la biosynthèse des nucléotides [Tong et al. 2009, Jiang et al. 2014]. L'entrée de glucose et de glutamine et leur catabolisme sont des processus clés pour produire les précurseurs de la voie des pentoses phosphates et promouvoir la synthèse de nucléotides [Tong et al. 2009]. Les cellules cancéreuses ont un niveau élevé pour l'activité de la G6PD et utilisent aussi bien la branche oxydative que la branche non-oxydative de la voie des pentoses phosphates, contrairement aux cellules qui ne prolifèrent pas, qui utilisent plutôt la branche oxydative [Phan et al. 2014].

- La synthèse des purines

Les nucléotides puriques sont synthétisés par deux voies différentes, la synthèse *de novo* ou la voie de sauvetage [Kondo et al. 2000, Stryer et al. 2007]. Pour la synthèse *de novo* des purines, la voie des pentoses phosphates génère le R5P, qui avec de l'ATP, produit le 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP) *via* la PRPP synthétase, une enzyme limitante de la voie (**Figure 7**) [Allison and Eugui 1993, Allison and Eugui 2000]. Ensuite, l'anneau de purine est assemblé à un ribose phosphate, et après plusieurs étapes régulées par 6 enzymes très conservées, l'inosine monophosphate (IMP) est produit [Allison and Eugui 1993, Allison and Eugui 2000, Chan et al. 2015]. Ensuite, l'IMP peut être converti en adénosine monophosphate (AMP) par l'adénosine déaminase ou en guanosine monophosphate (GMP) par l'IMP déshydrogénase (IMPDH) [Allison 2000, Allison and Eugui 2000]. Finalement, l'AMP et le GMP peuvent être convertis en ATP ou en guanosine triphosphate (GTP) pour la synthèse d'ARN ou en désoxyadénosine triphosphate (dATP) ou désoxyguanosine triphosphate (dGTP) comme substrats de l'ADN polymérase [Allison 2000, Allison and Eugui 2000, Stryer et al. 2007].

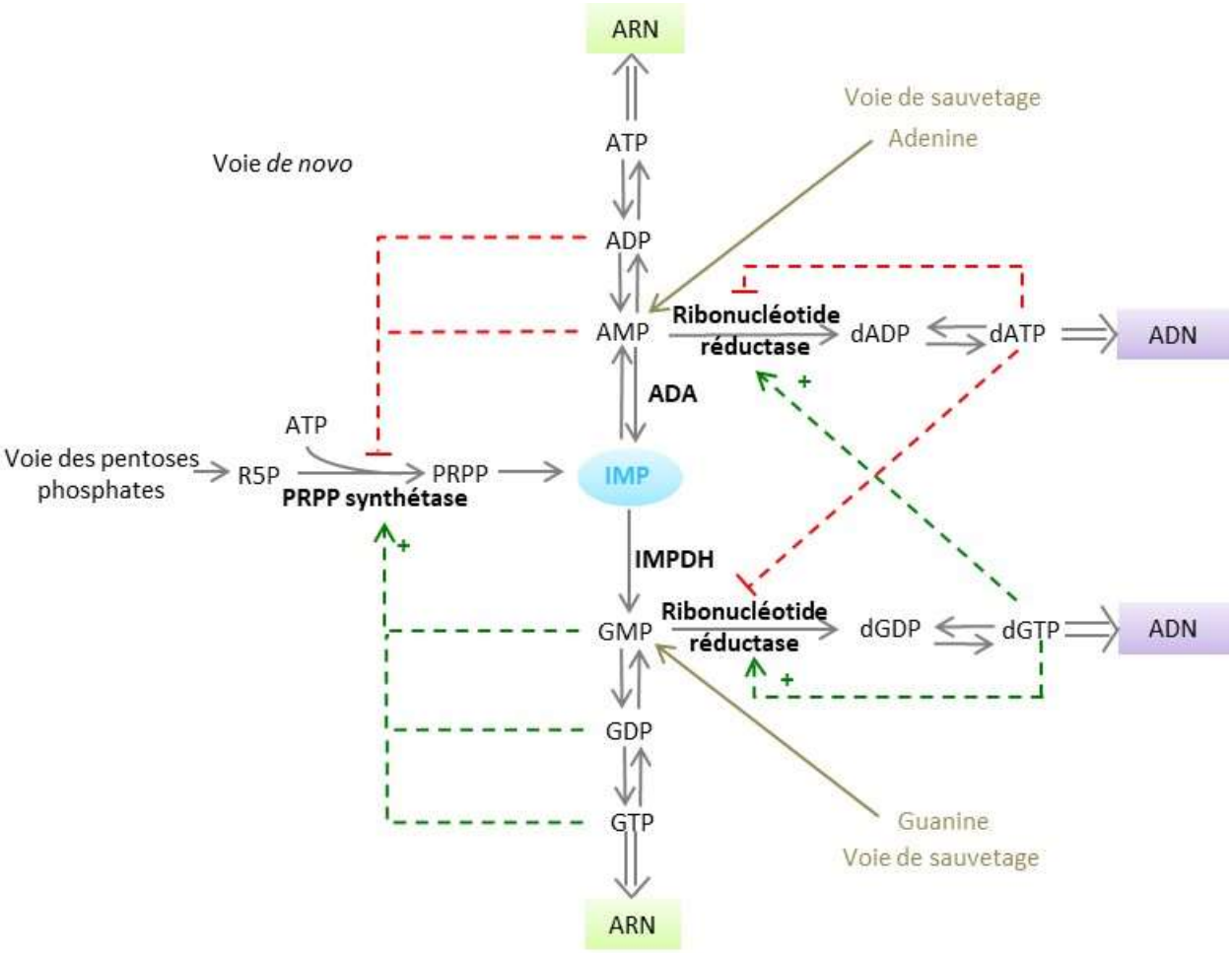


Figure 7. Représentation schématique de la synthèse *de novo* des purines.
La voie des pentoses phosphates produit le R5P, qui est converti en PRPP par le PRPP synthétase. PRPP est transformé en IMP, le point de ramification de la synthèse des purines. L'IMP peut être converti en AMP (et ADP et ATP) par ADA ou en GMP (et GDP et GTP) par l'IMPDH pour la synthèse d'ARN. La voie de sauvetage de synthèse des purines fournit l'adénine ou la guanine pour produire directement de l'AMP ou du GMP respectivement. Ensuite, l'AMP peut être converti en dADP (et dATP) ou le GMP en dGDP (et dGTP) par la ribonucléotide réductase pour la synthèse d'ADN. ADA: adénosine deaminase; ADP: adénosine diphosphate; AMP: adénosine monophosphate; ATP: adénosine triphosphate; dADP: deoxyadénosine diphosphate; dATP: deoxyadénosine triphosphate; dGDP: deoxyguanine diphosphate; dGTP: deoxyguanine triphosphate; GDP: guanosine diphosphate; GMP: guanosine monophosphate; GTP: guanosine triphosphate; IMP: inosine monophosphate; IMPDH: IMP deshydrogenase; PRPP synthetase: 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate synthétase; PRPP: 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate; R5P: ribose-5-phosphate; XMP: xanthosine monophosphate. Modifiée de: [Stryer et al. 2007, Fernández-Ramos et al. 2016].

- La synthèse des pyrimidines

L'uracile et la cytosine font partie des nucléotides pyrimidiques et peuvent être synthétisés par la voie de synthèse *de novo* ou de sauvetage (seulement pour l'uracile). La voie *de novo* utilise le R5P de la voie des pentoses phosphates pour produire le PRPP. Ensuite, après une série de réactions, l'uridine monophosphate (UMP) est produit, qui est ensuite converti en uridine diphosphate (UDP)

puis en uridine triphosphate (UTP). L'UTP peut être le produit final ou être converti en cytidine triphosphate (CTP) avec consommation d'ATP et de glutamine comme donneur du groupe amino [Stryer et al. 2007].

II.3. Les «checkpoints» métaboliques

La reprogrammation métabolique est régulée au niveau transcriptionnel par HIF-1α et Myc, et au niveau post-transcriptionnel par la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK, de l'anglais, AMP-activated protein kinase), par Akt et par mTOR (**Figure 8**). Ces molécules sont identifiées comme des «checkpoints» métaboliques parce qu'elles font le lien entre les voies de signalisation cellulaire et les voies métaboliques [MacIver et al. 2013]. En raison de l'importance du métabolisme dans les cellules cancéreuses et dans les cellules du système immunitaire pour assurer leur prolifération rapide, les «checkpoints» métaboliques constituent potentiellement de nouvelles cibles thérapeutiques [Pollizzi and Powell 2014].

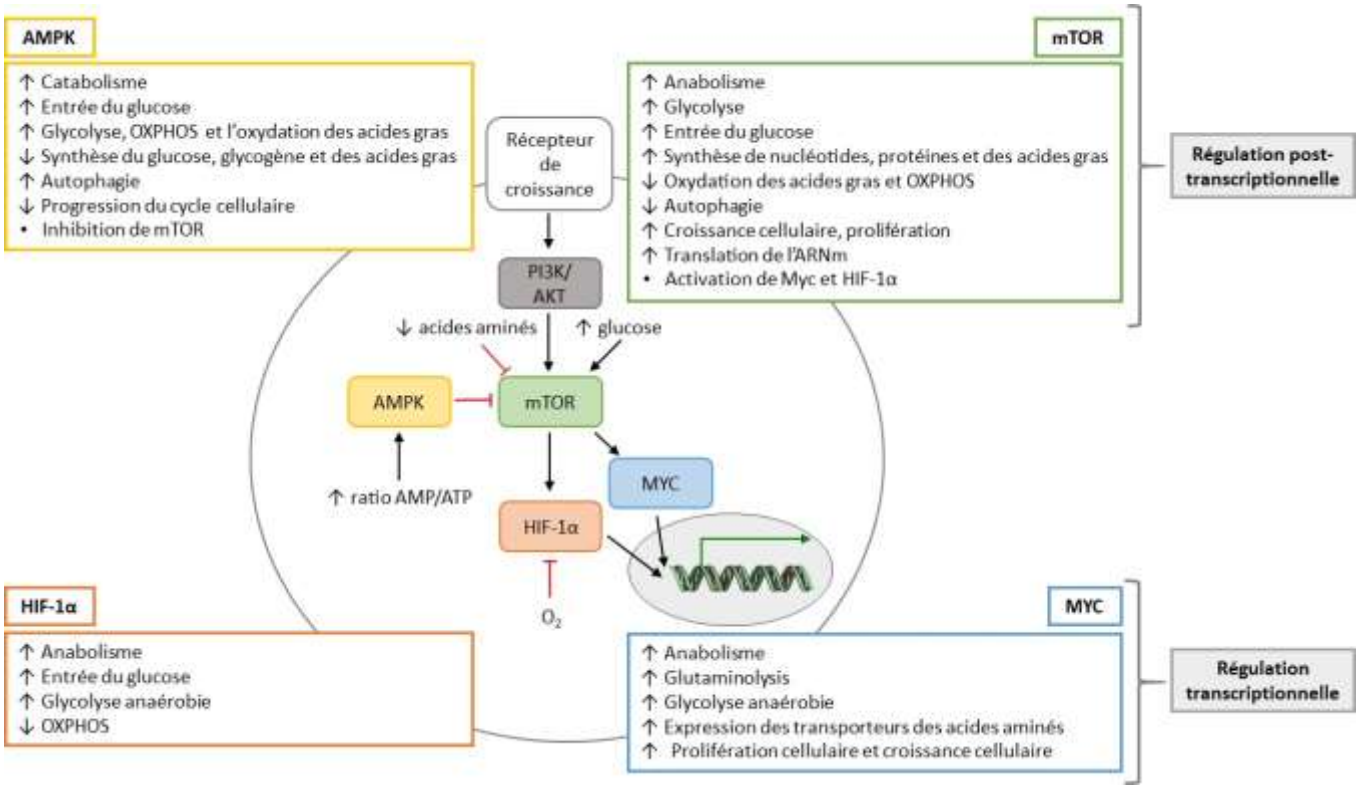


Figure 8. Les «checkpoints» métaboliques et leurs rôles dans le métabolisme cellulaire.
La régulation post-transcriptionnelle du métabolisme est principalement assurée par les «checkpoints» métaboliques AMPK et mTOR. La régulation transcriptionnelle est assurée essentiellement par Myc et HIF-1α. AMPK inhibe mTOR et mTOR régule HIF-1α et Myc. Akt: protéine kinase B ou PKB; AMP: adénosine monophosphate; AMPK: protéine kinase activée par l'AMP; ATP: adénosine triphosphate; HIF-1α: facteur inductible par l'hypoxie 1 α; mTOR: cible de la rapamycine chez les mammifères; OXPHOS: phosphorylation oxydative. Modifiée de: [Fernández-Ramos et al. 2016].

II.3.1. AMPK

AMPK est un complexe sérine/thréonine kinase hétérotrimérique très conservé sensible au ratio AMP/ATP intracellulaire, autrement dit à la carence énergétique [Gwinn et al. 2008, Inoki et al. 2012, Wang and Green 2012a, Faubert et al. 2013]. En effet, un ratio AMP/ATP élevé (suite à une diminution du pool d'ATP) conduit à l'activation d'AMPK pour assurer la production de l'ATP, se traduisant par une augmentation de l'entrée du glucose, une activation de l'OXPHOS et des processus cataboliques comme la glycolyse et l'oxydation des acides gras et, en parallèle, une inhibition de la synthèse du glucose, du glycogène et des acides gras [Gwinn et al. 2008, Macintyre and Rathmell 2013, MacIver et al. 2013, Pearce et al. 2013, Green et al. 2014, Pollizzi and Powell 2014].

L'activité AMPK inhibe la progression du cycle cellulaire et favorise l'autophagie, un processus catabolique qui induit la dégradation et le recyclage des composants cellulaires en situation de carence énergétique [Pearce 2010, MacIver et al. 2013, Pearce et al. 2013]. La privation en nutriments et l'hypoxie activent AMPK *via* la phosphorylation de sa boucle d'activation [Gwinn et al. 2008]. L'AMPK activée inhibe l'activité de mTOR par phosphorylation de Raptor, une protéine du complexe 1 de la cible de la rapamycine chez les mammifères (mTORC1) avec pour conséquence une réduction de l'expression de HIF-1α et de Myc [Gwinn et al. 2008, Cairns et al. 2011, MacIver et al. 2013]. Quand la concentration d'ATP intracellulaire est faible, l'inhibition de mTOR par AMPK est associée à une diminution de la traduction générale des ARNm qui consomme beaucoup d'énergie [Pearce et al. 2013, Blagih et al. 2015]. La metformine (1,1-diméthylbiguanide), un activateur d'AMPK, est indiquée comme traitement de première ligne dans le diabète de type II mais présente aussi une activité anti-tumorale [Viollet et al. 2012, Salani et al. 2014]. En effet, la metformine régule la reprogrammation métabolique *via* le blocage du complexe I de la chaîne respiratoire, ce qui conduit à une diminution de l'ATP intracellulaire, une stimulation de la glycolyse et une augmentation de la production de lactate [Marini et al. 2013, Salani et al. 2014].

II.3.2. PI3K/Akt

Akt (PKB) est une sérine/thréonine kinase, intervenant en aval de la protéine PI3K [Macintyre and Rathmell 2013]. La voie PI3K/Akt répond aux signaux des facteurs de croissance et modifie le métabolisme pour favoriser la biosynthèse des intermédiaires nécessaires à la croissance et la prolifération cellulaire *via* l'activation de mTOR [Pearce 2010, MacIver et al. 2013]. Dans les tumeurs, des mutations oncogéniques activent Akt favorisent le métabolisme glycolytique des cellules tumorales par captation accrue du glucose suite à une augmentation de l'expression membranaire des transporteurs du glucose [Macintyre and Rathmell 2013, Iurlaro et al. 2014].

La voie PI3K/Akt peut être inhibée par PTEN (de l'anglais, phosphatase and tensin homolog), qui régule la croissance, le métabolisme et la survie cellulaire avec un effet suppresseur de tumeurs

important. Au cours de la cancérogénèse, la perte de PTEN s'accompagne d'une augmentation de la glycolyse alors qu'une augmentation de l'expression de PTEN peut réorienter la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses de la glycolyse aérobie vers l'OXPHOS [Cairns et al. 2011, Iurlaro et al. 2014].

II.3.3. mTOR

mTOR est une enzyme de la famille des sérine/thréonine kinase très conservée qui régule l'autophagie, la croissance cellulaire, la prolifération et l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme pour favoriser l'entrée du glucose, la glycolyse et la synthèse de nucléotides, des protéines et des lipides [Chi 2012, Inoki et al. 2012, Waickman and Powell 2012, Pearce et al. 2013, Pollizzi and Powell 2014]. Le niveau d'activité de la kinase est augmenté en cas de pool intracellulaire élevé en nutriments, particulièrement en glucose et en glutamine [Maciolek et al. 2014, Roberts et al. 2014]. Plus spécifiquement, mTORC1 et mTORC2 (cible de la rapamycine chez les mammifères complexe 2) sont deux complexes protéiques différents ayant des cibles et des fonctions cellulaires distinctes [Jiang and Liu 2008, Inoki et al. 2012, Waickman and Powell 2012, Pollizzi and Powell 2014].

Le complexe mTORC1 est constitué de mTOR, mLST8 (mammalian lethal with Sec13 protein 8), PRAS40 (proline-rich Akt substrate of 40 kDa), WD40 et Raptor (regulatory-associated protein of mTOR), qui recrute les substrats cibles du complexe [Gwinn et al. 2008, Wouters and Koritzinsky 2008, Inoki et al. 2012, Waickman and Powell 2012, Roberts et al. 2014]. mTORC1 induit la synthèse de protéines par la phosphorylation et l'activation de p70s6k (ribosomal s6 kinase) pour favoriser la biogénèse ribosomale *via* la phosphorylation et l'inhibition du facteur 4EBP1 (eukaryotic initiation factor 4E binding protein) nécessaire à la traduction des ARNm [Jiang and Liu 2008, Waickman and Powell 2012, MacIver et al. 2013, Zhdanov et al. 2015]. L'activité de mTORC1 est régulée négativement par AMPK et positivement par la voie de signalisation PI3K/Akt. Quand le ratio ADP/ATP est élevé, AMPK phosphoryle Raptor, ce qui entraîne la fixation d'une protéine de la famille 14-3-3 (protéines très conservées qui régulent plus de 200 protéines de signalisation) avec comme conséquence, l'inhibition de l'activité de mTORC1. Quand la voie PI3K/Akt est activée, Akt phosphoryle la sous-unité PRAS40, induisant la liaison d'une autre protéine de la famille 14-3-3, avec inhibition de la protéine inhibitrice du complexe, ce qui entraîne l'activation du mTORC1 [Pozuelo-Rubio 2012].

Le complexe mTORC1 est un activateur de l'expression des «checkpoints» métaboliques HIF-1α et Myc [Gwinn et al. 2008, Waickman and Powell 2012, Macintyre and Rathmell 2013, Green et al. 2014, Pollizzi and Powell 2014] et va ainsi réguler plusieurs voies anaboliques: *via* HIF-1α, mTORC1 active (en plus de la glycolyse) la synthèse de nucléotides par la voie des pentoses phosphates et par le facteur de transcription SREBP1 (sterol regulatory element-binding protein 1), la synthèse

de lipides. Enfin, mTORC1 active certaines enzymes de la voie de synthèse des pyrimidines [Iurlaro et al. 2014].

Le complexe mTORC2, ayant un rôle biologique moins connu que celui de mTORC1, est composé de mLST8, Rictor, mSIN1 (de l'anglais, mammalian stress-activated protein kinase interacting protein) et Protor. mTORC2 régule l'organisation du cytosquelette d'actine et l'activation de l'Akt par phosphorylation de la Ser473, favorisant la survie cellulaire. De plus, mTORC2 est peu sensible à la rapamycine sauf dans des traitements chroniques de longue durée [Araki et al. 2010, Powell and Delgoffe 2010, Li et al. 2014].

II.3.4. HIF-1α

Le complexe HIF contient une sous-unité régulatrice alpha et une sous-unité constitutive béta, toutes deux appartenant à la famille des facteurs de transcription bHLH/PAS (protéines contenant, en plus du domaine basique bHLH (pour basic helix-loop-helix), un domaine PAS (pour Per-Arnt-Sim)). La sous-unité alpha, désignée par HIF-1α, est régulée par l'oxygène. En condition hypoxique, HIF-1α facilite l'adaptation cellulaire par régulation de plus de 100 gènes (incluant GLUT1, GLUT3, PFKFB3, lactate déshydrogénase A ou LDHA, anhydrase carbonique 9 ou CA9) pour favoriser la survie cellulaire et en activant notamment la voie de la glycolyse [Nizet and Johnson 2009, Green et al. 2014].

La protéine HIF-1α est principalement régulée par hydroxylation de deux résidus prolines (P402 et P564) par l'enzyme PHD2 (prolyl-hydroxylase domain 2). PHD2 utilise deux molécules d'O_2, une pour l'hydroxylation de HIF-1α et l'autre pour l'oxydation de l'α-cétoglutarate en succinate, deux intermédiaires du cycle de Krebs [Selak et al. 2005, Eltzschig and Carmeliet 2011, Green et al. 2014]. L'activité de PHD2 est inhibée par le succinate, les espèces réactives de l'oxygène (ERO, en anglais reactive oxygen species, ROS) et l'hypoxie, alors qu'elle est activée en normoxie et par l'α-cétoglutarate [Selak et al. 2005, Wang and Green 2012a, Green et al. 2014]. Le métabolisme du glucose et de la glutamine peut moduler l'activité de PHD2 par la production d'α-cétoglutarate, de succinate, d'ERO et autres intermédiaires du cycle de Krebs. L'hydroxylation de HIF-1α par PHD2 permet la liaison avec la protéine VHL (von Hippel-Lindau), qui est un constituant du complexe E3 ubiquitine protéine ligase participant à l'ubiquitinylation des protéines et leur dégradation rapide par le protéasome. Lors de l'hypoxie, le facteur HIF-1α n'est pas dégradé et migre dans le noyau pour s'hétérodimériser avec le facteur inductible par l'hypoxie 1 β (HIF-1β ou ARNT), la sous-unité constitutive du complexe HIF. Ce complexe est ensuite recruté au niveau des éléments de réponse à l'hypoxie (HRE, de l'anglais, hypoxic-response element) situés dans les régions promotrices des différents gènes permettant à la cellule de s'adapter au stress. En particulier, HIF-1α augmente le flux glycolytique qui a des effets cytoprotecteurs [Nizet and Johnson 2009, Green et al. 2014]. HIF-1α stimule la glycolyse en activant la transcription de gènes qui codent pour les transporteurs du glucose et de la plupart des enzymes de la glycolyse (10 sur 13 sont activées). De plus, HIF-1α

active la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK), ce qui inactive le complexe pyruvate déshydrogénase avec réduction du flux du pyruvate vers le cycle de Krebs, puis diminution de l'OXPHOS [Cairns et al. 2011]. HIF-1α facilite le passage de l'OXPHOS vers la glycolyse aérobie, par induction des transporteurs GLUT1 et GLUT3 et certaines enzymes de la glycolyse comme l'hexokinase de type 1 (HK1) et HK2, la PFK1 et la phosphofructokinase-2 (PKF2), l'énolase 1 (ENO1), la LDHA et la PKM2 [Rodríguez-Enríquez et al. 2009, Iurlaro et al. 2014].

Enfin, il existe d'autres voies indépendantes de l'hypoxie qui régulent l'expression ou la dégradation de HIF-1α. Les voies Akt et Erk activent mTORC1, avec pour conséquence, l'augmentation de l'expression de HIF-1α. À l'opposé, AMPK inhibe l'activité de mTORC1 et ainsi l'expression de HIF-1α [Cairns et al. 2011, Zhdanov et al. 2015].

II.3.5. Myc

Myc est un facteur de transcription oncogénique avec un domaine hélice-boucle-hélice avec une glissière à leucine (en anglais, leucine zipper). Myc contrôle de nombreux processus biologiques comme la prolifération, la progression du cycle cellulaire, la croissance cellulaire, le métabolisme, l'apoptose, la différenciation et la réponse au stress par l'induction de ses gènes cibles. En effet, Myc se fixe sur 10 à 15% des promoteurs de tous les gènes connus [Tarrado-Castellarnau et al. 2016]. Myc peut s'hétérodimériser avec MAX (de l'anglais, c-Myc associated protein X) et le complexe activé reconnaît les séquences «E box» [Soga 2013, Hsieh et al. 2015, Tarrado-Castellarnau et al. 2016]. L'activité de Myc est fréquemment dérégulée dans les cellules tumorales [Hsieh et al. 2015].

Myc favorise la glycolyse par augmentation du transporteur GLUT1 et par activation d'enzymes de la voie de la glycolyse incluant HK2, glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), ENO1, PKM2, GLUT1, GLUT3, PFK1. De plus, Myc favorise la production de lactate par augmentation de la LDH et son export par augmentation du transporteur 1 de monocarboxylate (MCT1) [Rodríguez-Enríquez et al. 2009, Tarrado-Castellarnau et al. 2016]. Enfin, Myc favorise la biogénèse mitochondriale par induction des gènes impliqués dans la fonction et la structure mitochondriale comme le facteur de transcription mitochondrial A (TFAM), qui favorise la transcription du génome mitochondrial [Iurlaro et al. 2014, Morrish and Hockenbery 2014].

L'activation de la glutaminolyse dans les cellules cancéreuses est principalement régulée par Myc. En effet, Myc facilite le passage intracellulaire de la glutamine et son catabolisme par augmentation de l'expression du transporteur des acides aminés neutres (ASCT2 ou SLC1A5) et du transporteur de glutamine du système N2 (SN2 ou SNAT5), et également de l'activité de la glutaminase 1 (GLS1) [Daye and Wellen 2012, Iurlaro et al. 2014, Phan et al. 2014]. L'activation de la glutaminolyse par Myc permet la production d'α-cétoglutarate, qui servira de substrat pour réapprovisionner le cycle de Krebs [Wang et al. 2011, Macintyre and Rathmell 2013, Iurlaro et al. 2014]. De plus, Myc active la synthèse de nucléotides en régulant plusieurs enzymes du

métabolisme comme CAD (carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase et dihydroorotase), CTPS (cytidine triphosphate synthetase), et ODC (ornithine decarboxylase)[Tarrado-Castellarnau et al. 2016].

II.4. La reprogrammation métabolique dans les lymphocytes T

Récemment, les similarités entre la reprogrammation métabolique dans les cellules cancéreuses et certaines cellules du système immunitaire ont été identifiées. L'étude du métabolisme dans les cellules du système immunitaire est désignée par le terme général d'«immunométabolisme». L'activation des lymphocytes T s'accompagne d'une réorientation du métabolisme dans le but d'assurer une croissance et une expansion clonale massive, mais aussi permettre la différenciation lymphocytaire et leurs fonctions effectrices [Pearce and Pearce 2013, Maciolek et al. 2014, Loftus and Finlay 2016]. De plus, le recrutement et la prolifération des lymphocytes T ont lieu souvent dans des zones pauvres en oxygène et en nutriments [Pearce et al. 2013].

Le métabolisme des lymphocytes T est dynamique, car il change selon leur état d'activation [Pearce et al. 2013]. Les lymphocytes T, tout comme d'autres cellules du système immunitaire, ont la capacité d'évoluer de cellules T naïves en cellules T activées après avoir été en contact avec un signal d'activation [Macintyre and Rathmell 2013, Pearce and Pearce 2013]. Après activation par des signaux spécifiques, une modification du transcriptome lymphocytaire favorise la synthèse de cytokines et de médiateurs lipidiques pour faciliter la migration, la prolifération et la différenciation des cellules T [Pearce and Pearce 2013, Pearce et al. 2013]. Le métabolisme lymphocytaire et les fonctions du système immunitaire sont étroitement liés puisque l'activation des lymphocytes T est associée à des variations dans les besoins métaboliques dans le but d'assurer les fonctions effectrices ainsi que la prolifération cellulaire rapide [MacIver et al. 2013, Pearce and Pearce 2013, Pearce et al. 2013]. Les recherches actuelles visent à élucider l'impact du métabolisme des lymphocytes T sur leur rôle dans l'immunité afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour contrôler ou moduler les réponses lymphocytaires [Pearce 2010, Macintyre and Rathmell 2013, Pearce et al. 2013].

II.4.1. Métabolisme des lymphocytes T

Le métabolisme des lymphocytes T peut varier et dépend de l'état d'activation cellulaire. Les cellules T naïves qui n'ont pas encore rencontré de signaux d'activation, ont un métabolisme quiescent. Après activation, les lymphocytes T deviennent effecteurs, cette variation d'état s'accompagnant d'un changement métabolique. Par la suite, une fraction des lymphocytes activés va devenir des cellules T mémoires, qui présentent un métabolisme basal moins «activé» que celui des cellules T effectrices mais qui reste adapté à un éventuel changement rapide, notamment dans le cas d'une réactivation lymphocytaire [Pearce et al. 2013] (**Figure 9**).

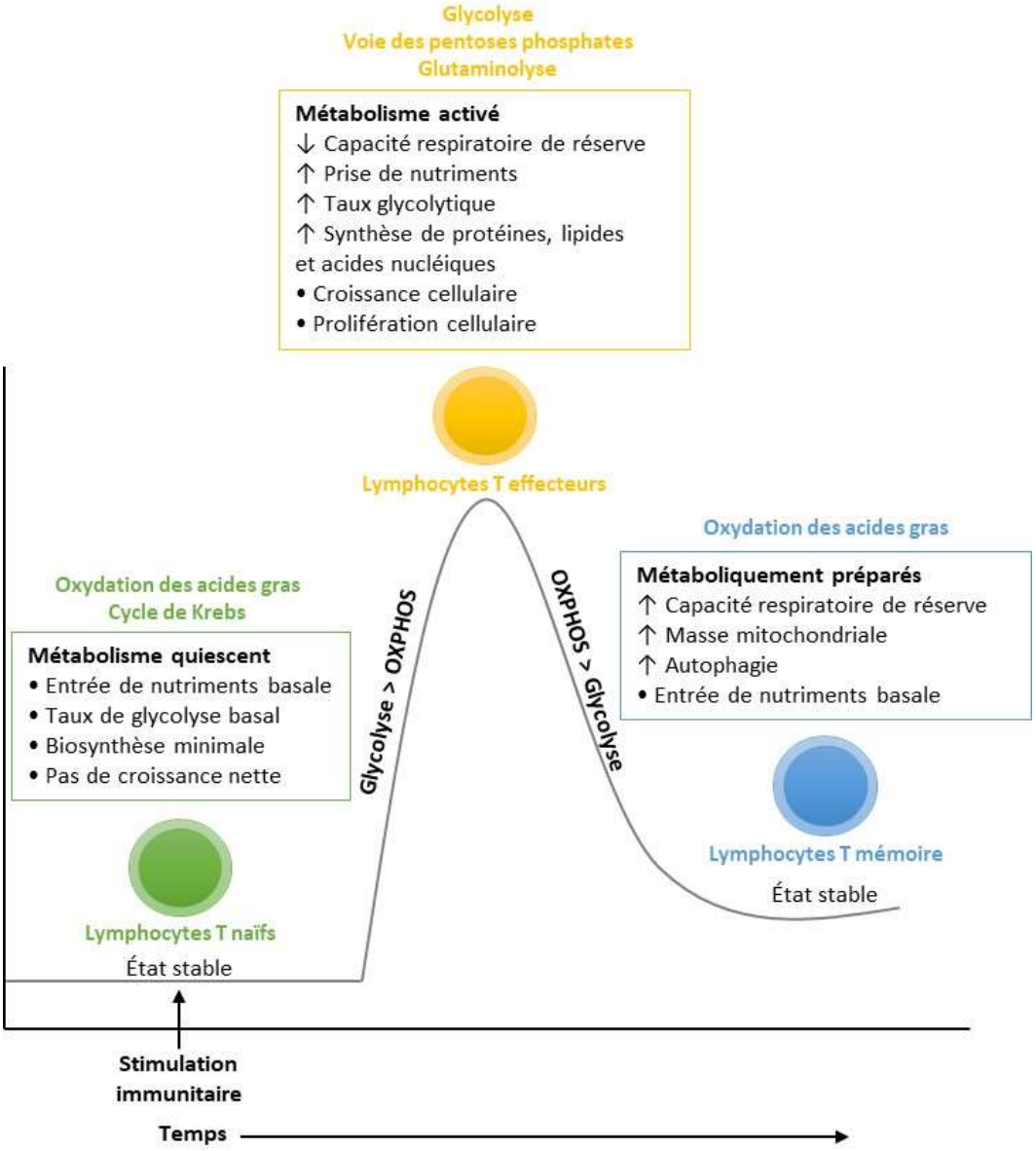


Figure 9. Variations du métabolisme des lymphocytes T au cours d'une réponse immunitaire. Le profil métabolique des lymphocytes T varie selon leur état d'activation. Les lymphocytes T naïfs sont métaboliquement quiescents, avec un niveau basal d'entrée de nutriments, de glycolyse et de biosynthèse des macromolécules. Lorsque les lymphocytes T deviennent activés, leur métabolisme évolue du niveau basal vers un niveau «activé», ce qui se traduit par une diminution de la capacité respiratoire de la mitochondrie, une augmentation de l'entrée de nutriments et du flux glycolytique s'accompagnant de la synthèse de protéines, de lipides et d'acides nucléiques. La glycolyse est privilégiée à l'OXPHOS pour la production d'ATP. Un faible pourcentage de lymphocytes devient des cellules T mémoire, avec un métabolisme quiescent basé surtout sur l'oxydation des acides gras et l'OXPHOS, suggérant que ces cellules ont été programmées pour s'adapter rapidement face à une éventuelle re-stimulation. OXPHOS: phosphorylation oxydative. Modifiée de: [Pearce et al. 2013, Slack et al. 2015].

Les cellules T quiescentes naïves (qui n'ont pas rencontré d'antigène) dépendent principalement de l'OXPHOS ou de l'oxydation des acides gras pour produire l'ATP. Elles ont un taux basal d'entrée de nutriments et de glycolyse. Il n'y a pas de croissance nette et la biosynthèse est minimale [Pearce et al. 2013].

Après activation, les lymphocytes génèrent des cellules T clonales par reprogrammation de leur métabolisme pour s'adapter aux nouveaux besoins [Pearce 2010, Wang and Green 2012b, Macintyre and Rathmell 2013, Pearce and Pearce 2013, O'Sullivan and Pearce 2015]. Les lymphocytes effecteurs migrent vers leur site d'action par exemple suite à une infection ou une inflammation [Pearce et al. 2013, Cao et al. 2014, O'Sullivan et al. 2014]. Ces cellules passent d'un environnement riche en nutriments et en oxygène vers un milieu pauvre en glucose et en oxygène, avec de l'acidose et du stress oxydatif dans le site d'infection [Nizet and Johnson 2009, Macintyre and Rathmell 2013, MacIver et al. 2013].

Les signaux liés au récepteur des cellules T (TCR) entraînent une augmentation de l'expression de HK2, des transporteurs du glucose (GLUT1 et GLUT3) et des acides aminés SLC7A5 (solute carrier family 7 member 5 ou LAT1, transporteur humain d'acides aminés de type L1), en vue de faciliter la glycolyse aérobie et la glutaminolyse, qui permettent l'alimentation du cycle de Krebs et l'accumulation de la biomasse [Wang and Green 2012b, Macintyre and Rathmell 2013, Pearce et al. 2013, Maciolek et al. 2014, Pollizzi and Powell 2014, Yang et al. 2015b]. De manière similaire, le niveau d'expression des enzymes PFKFB3, PFK, aldéhyde déshydrogénase (ALD), triose-phosphate isomérase (TPI), phosphoglycerate kinase (PGK), phosphoglycerate mutase (PGAM), PKM2 et LDH sont augmentés après l'activation des lymphocytes T parce qu'elles favorisent la glycolyse aérobie et également l'accumulation des intermédiaires de synthèse [Macintyre and Rathmell 2013, Pearce et al. 2013, Maciolek et al. 2014]. Bien que le pyruvate soit principalement converti en lactate dans les lymphocytes T activés, un faible pourcentage continue à être dégradé dans le cycle de Krebs couplé à l'OXPHOS [Pearce et al. 2013].

Le glucose est la source de carbone la plus importante pour les lymphocytes T et une glycolyse fonctionnelle est nécessaire pour la prolifération des cellules T [Maciolek et al. 2014, Yang et al. 2014]. La délétion des transporteurs du glucose empêche la transition vers les cellules T effectrices. Par exemple, une déficience en GLUT1 diminue l'expansion des lymphocytes effecteurs et augmente les lymphocytes T régulateurs, suggérant le rôle important de GLUT1 dans la reprogrammation métabolique des lymphocytes T [Macintyre et al. 2014, Buck et al. 2015]. Blagih *et al.* ont montré que les cellules T effectrices sont capables d'adapter leur métabolisme en réponse à une faible disponibilité en glucose. Elles utilisent alors l'OXPHOS dépendant davantage de la glutamine pour maintenir la concentration d'ATP et la viabilité cellulaire [Blagih et al. 2015]. La privation de glutamine bloque la prolifération et la différenciation des lymphocytes T et la production des cytokines car c'est la source principale d'azote pour la production des acides

aminés non-essentiels mais aussi des nucléotides [Wang and Green 2012b, Pollizzi and Powell 2014, Yang et al. 2014, O'Sullivan and Pearce 2015, Loftus and Finlay 2016].

La voie des pentoses phosphates est fortement induite dans les lymphocytes T activés car elle permet la synthèse de nucléotides et du NADPH, un coenzyme critique pour la synthèse des acides gras et pour la régénération du glutathion réduit [Macintyre and Rathmell 2013, Pearce and Pearce 2013, Maciolek et al. 2014].

Les lymphocytes T activés augmentent la synthèse des acides gras en diminuant leur oxydation, facilitant ainsi l'accumulation des acides gras nécessaires pour la synthèse d'organelles et des membranes, comme les phospholipides. Le facteur de transcription SREBP régule la reprogrammation métabolique du métabolisme lipidique [Buck et al. 2015].

Comme pour les cellules cancéreuses, le pool de purines et pyrimidines des lymphocytes T activés augmente pour permettre la division cellulaire rapide [Quéméneur et al. 2003]. La concentration des nucléotides est cruciale pour la prolifération des lymphocytes T après activation antigénique et mitogénique [Allison and Eugui 1993, Allison and Eugui 2000, Quéméneur et al. 2002]. Une des enzymes clé dans la synthèse de purines, l'IMPDH, a une activité augmentée dans les cellules T activés par rapport aux cellules T quiescentes [Quéméneur et al. 2002]. De plus, l'inhibition de l'IMPDH, par exemple par l'acide mycophénolique (MPA, de l'anglais, mycophenolic acid), bloque les cellules en phase G_1 par défaut de production de guanine [Laliberté et al. 1998]. De plus, les lymphocytes T et B sont davantage dépendants de la synthèse *de novo* des purines car la voie de sauvetage n'est pas ou peu active dans ces cellules [Allison and Eugui 1993, Allison and Eugui 2000].

Les lymphocytes T mémoire présentent un métabolisme dit «non-prolifératif», dépendant principalement de l'oxydation des acides gras, et produisent l'ATP par l'OXPHOS avec une diminution de l'entrée des nutriments [Wang and Green 2012b, Macintyre and Rathmell 2013, MacIver et al. 2013, Pearce and Pearce 2013]. Ces cellules génèrent de l'acétyl-CoA à partir de l'oxydation des acides gras pour fournir le cycle de Krebs. Ce mécanisme est énergétiquement efficace, puisque 106 molécules d'ATP sont produites par molécule de palmitate *versus* 36 avec le glucose. De plus, il est essentiel pour une réponse immunitaire rapide des cellules T mémoire et pour la survie à long terme [Loftus and Finlay 2016]. Enfin, les T mémoire ont une augmentation à la fois de la masse mitochondriale et de la capacité respiratoire de la mitochondrie [Pearce and Pearce 2013, Pearce et al. 2013].

II.4.2. Régulation du métabolisme lymphocytaire par les «checkpoints» métaboliques

Après la reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T, les «checkpoints» métaboliques régulent les activités enzymatiques des voies du catabolisme et de l'anabolisme pour promouvoir l'activation, la différenciation, la prolifération et les fonctions lymphocytaires [Wang and Green 2012b, Pearce and Pearce 2013, Pollizzi and Powell 2014] (**Tableau 2**).

«Checkpoint» métabolique	Fonction métabolique	Fonction dans les lymphocytes T
AMPK	• Senseur du ratio AMP/ATP • En cas de carence en ATP: induction du catabolisme	• Activée après stimulation du TCR • Nécessaire à la génération des lymphocytes T mémoire
mTOR	• Régule la croissance cellulaire, la prolifération, la survie et l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme anabolique	• Activée après stimulation du TCR • Régule la différenciation des Th1, Th2 et Th17 • Nécessaire à la génération des lymphocytes effecteurs T $CD8^+$
Myc	• Régule la prolifération cellulaire, la croissance et l'apoptose • Favorise le métabolisme glycolytique et glutaminolytique	• Activé après stimulation du TCR • Nécessaire à la prolifération et l'activation après stimulation du TCR
HIF-1α	• En hypoxie, régule l'expression de gènes pour promouvoir la survie cellulaire	• Activé après stimulation du TCR • Nécessaire à la différenciation et la survie des Th17

Tableau 2. Rôles des «checkpoints» métaboliques dans le métabolisme des lymphocytes T.
AMPK: protéine kinase activée par l'AMP; HIF-1α: facteur inductible par l'hypoxie 1 α; mTOR: cible de la rapamycine chez les mammifères; TCR: récepteur des cellules T. Adapté de: [Pollizzi and Powell 2014].

Dans les lymphocytes T, l'AMPK favorise l'entrée du glucose mais inhibe la synthèse de glucose, du glycogène et des acides gras par inhibition de l'ACC et du SREBP1 [Pollizzi and Powell 2014]. L'AMPK facilite la biogenèse mitochondriale et le métabolisme oxydatif [Pollizzi and Powell 2014]. L'activation d'AMPK et l'inhibition de mTOR facilitent l'autophagie, mécanisme d'adaptation au stress cytoprotecteur pour maintenir l'homéostasie cellulaire. L'autophagie est un système de dégradation des protéines nécessaire pour éliminer les agrégats protéiques ainsi que les protéines mal conformées. Dans le système immunitaire, l'autophagie a un rôle important puisqu'elle régule l'entrée et la présentation des antigènes, l'élimination des pathogènes, l'inflammation dépendante de cytokines et la survie des cellules immunitaires [Pearce et al. 2013, Yang et al. 2015a, Wu and Adamopoulos 2017]. De plus, il a été montré les effets de l'autophagie sur le métabolisme car elle aide à l'accumulation des acides aminés intracellulaires par la dégradation des protéines et la régénération des lipides. Sachant que les réponses immunitaires ont besoin d'une reprogrammation métabolique, l'autophagie est un des mécanismes pour obtenir de l'énergie et les précurseurs des biomolécules [Yang et al. 2015a].

La voie Akt joue un rôle important en facilitant la glycolyse par phosphorylation de HK2, par induction de la LDH dans les lymphocytes T $CD8^+$ et également par augmentation de la migration du transporteur GLUT1 à la surface membranaire des lymphocytes [Wang and Green 2012a, Galluzzi et al. 2013, Macintyre and Rathmell 2013, MacIver et al. 2013, Cammann et al. 2016].

Dans les cellules T activés, mTOR active l'expression des facteurs HIF-1α et Myc, favorisant la transcription des ARNm des enzymes et des transporteurs impliqués dans le métabolisme du glucose [Waickman and Powell 2012, Macintyre and Rathmell 2013, Pollizzi and Powell 2014]. Myc et HIF-1α régulent positivement l'expression de GLUT1 et GLUT3 ainsi que leur localisation à la

membrane cellulaire [Macintyre and Rathmell 2013, Pearce et al. 2013, Iurlaro et al. 2014, Pollizzi and Powell 2014, Yang et al. 2015b]. GLUT1, le transporteur du glucose le plus important, est rapidement internalisé et dégradé dans les lymphocytes T mémoire en l'absence d'activation du TCR [MacIver et al. 2013, Maciolek et al. 2014, Yang et al. 2015b]. Des cellules déficientes en GLUT1 ont une diminution de l'entrée du glucose, de la glycolyse, de la croissance et de la prolifération des cellules T activées [Macintyre et al. 2014]. De plus, HIF-1α et Myc augmentent l'expression de LDHA, HK2 et PK [MacIver et al. 2013, Iurlaro et al. 2014, Pollizzi and Powell 2014].

Dans les lymphocytes T activés, HIF-1α induit la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la diminution de la consommation d'oxygène par la mitochondrie, orientant l'OXPHOS vers la glycolyse aérobie. Son rôle principal est d'optimiser l'énergie et l'homéostasie cellulaire pour promouvoir la survie cellulaire [Nizet and Johnson 2009, Macintyre and Rathmell 2013, Iurlaro et al. 2014]. Spécifiquement, HIF-1α favorise la glycolyse par augmentation de la G6P isomérase et de la PDK1, une enzyme qui inhibe l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs [MacIver et al. 2013, Iurlaro et al. 2014, Pollizzi and Powell 2014].

Après l'activation du TCR, l'expression de Myc est rapidement augmentée, régulée aussi par un niveau de glutamine élevée [Wang and Green 2012b]. Myc favorise la glycolyse, la biogenèse mitochondriale et la glutaminolyse par augmentation de la glutaminase et des transporteurs de glutamine [Iurlaro et al. 2014, Pollizzi and Powell 2014]. En l'absence de Myc, la glycolyse et la glutaminolyse dans les lymphocytes T sont diminuées, s'accompagnant d'une réduction des pools de nucléotides [Tong et al. 2009, Wang et al. 2011].

II.4.3. Métabolisme et différenciation des lymphocytes T

Après activation, les cellules T peuvent devenir des lymphocytes T régulateurs, mémoire ou effecteurs $CD4^+$ ou $CD8^+$ (**I. Le système immunitaire**) [Macintyre et al. 2014]. De plus, les effecteurs $CD4^+$ peuvent se différencier principalement en Th1, Th2 ou Th17 ou en cellules T mémoire quand le signal d'activation s'est arrêté [Parkin and Cohen 2001, Wang and Green 2012a, Macintyre et al. 2014]. Le métabolisme de chaque sous-type de lymphocyte T est lié à sa fonction. Sur le plan énergétique les cellules naïves dépendent de l'OXPHOS et les lymphocytes T régulateurs ou mémoire sont dépendants de l'oxydation des acides gras. Les différents sous-types de cellules T effectrices $CD4^+$ Th1, Th2 et Th17 et les $CD8^+$ dépendent de la glycolyse aérobie. En fait, un taux important de glycolyse est nécessaire pour l'efficacité des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ [Michalek et al. 2011, Wang and Green 2012b, Pollizzi and Powell 2014, Donnelly and Finlay 2015, Palmer et al. 2015, Palmer et al. 2016] (**Figure 10**).

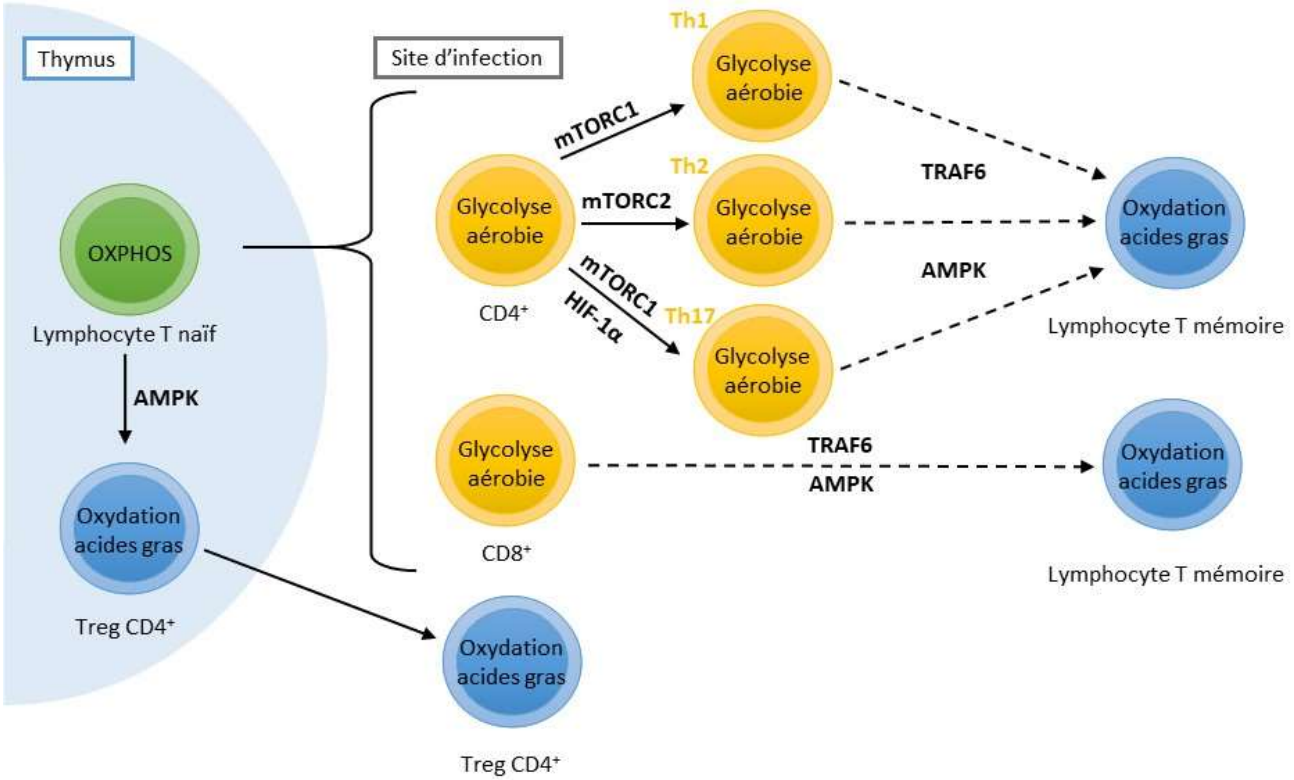


Figure 10. La différenciation des lymphocytes T est régulée par les «checkpoints» métaboliques.

Les cellules T naïves utilisent l'OXPHOS et après activation, elles peuvent se différencier en lymphocytes T régulateurs $CD4^+$ *via* AMPK ou en lymphocytes T effecteurs $CD4^+$ ou $CD8^+$. Les lymphocytes T régulateurs utilisent principalement l'oxydation des acides gras tandis que les lymphocytes T effecteurs utilisent préférentiellement la glycolyse aérobie. Les lymphocytes effecteurs $CD4^+$ peuvent se différencier en Th1 par la voie mTORC1, en Th2 par la voie mTORC2 ou en Th17 par la voie mTORC1 et HIF-1α. Les lymphocytes effecteurs $CD4^+$ et $CD8^+$ peuvent devenir des lymphocytes T mémoire, qui utilisent l'oxydation des acides gras, grâce à l'action de TRAF6 et AMPK. AMPK: protéine kinase activée par l'AMP; HIF-1α: facteur inductible par l'hypoxie 1 α; mTORC1/2: cible de la rapamycine chez les mammifères complexe 1/2; OXPHOS: phosphorylation oxydative; TRAF6: récepteur TNF associé au facteur 6. Modifiée de: [Fernández-Ramos et al. 2016].

La différenciation de chaque sous-type de lymphocytes T $CD4^+$ est régulée par les différents «checkpoints» métaboliques. La différenciation du sous-type Th1 est principalement régulée par mTORC1, celle du sous-type Th2 par mTORC2 et mTORC1 et HIF-1α pour le sous-type Th17 [Yang et al. 2013, Pollizzi and Powell 2014, Pollizzi et al. 2015]. Par contre, les cellules T $CD4^+$ régulatrices dépendent du métabolisme oxydatif, c'est-à-dire, de l'oxydation des lipides et l'OXPHOS, et sont régulées par AMPK [Chi 2012, Waickman and Powell 2012, MacIver et al. 2013, Pearce et al. 2013]. Les voies TRAF (tumour necrosis factor receptor-associated factor 6) et AMPK, *via* l'inhibition de mTOR, favorisent la différenciation des cellules T mémoire $CD8^+$, qui utilisent l'oxydation des acides gras comme mécanisme principal énergétique [Chi 2012, Waickman and Powell 2012, MacIver et al. 2013, Pearce et al. 2013, Maciolek et al. 2014, Pollizzi and Powell 2014].

HIF-1α, en plus d'induire le développement et la fonction des Th17, ralentit la différenciation des lymphocytes T régulateurs par ciblage de FOXP3 pour la dégradation par le protéasome [Dang et al. 2011, Pollizzi and Powell 2014]. Des cellules T effectrices déficientes en HIF-1α ne produisent pas d'IL-17 et s'orientent vers un métabolisme plus similaire à celui des cellules T régulatrices dépendants du métabolisme lipidique [Macintyre and Rathmell 2013, Pollizzi and Powell 2014]. De plus, HIF-1α augmente l'expression de certains gènes anti-apoptotiques dans les lymphocytes Th17 [Pollizzi and Powell 2014]. En conditions normoxiques, la différenciation des lymphocytes T régulateurs est favorisée par la régulation de FOXP3 *via* HIF-1α pour limiter les effets secondaires liés à l'hypoxie au niveau des sites d'infection [Clambey et al. 2012, Pearce et al. 2013].

AMPK et mTOR régulent aussi la différenciation des lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques car mTOR favorise la génération des lymphocytes T $CD8^+$ en supprimant la différenciation des cellules T régulatrices $FOXP3^+$ [Chi 2012, Waickman and Powell 2012, Sinclair et al. 2013, Maciolek et al. 2014, Pollizzi and Powell 2014, Pollizzi et al. 2015, Yang et al. 2015b]. L'inhibition de mTOR régulée par AMPK et l'inhibition de la glycolyse dans les lymphocytes T $CD8^+$ favorise la génération des lymphocytes T $CD8^+$ mémoire [Pollizzi and Powell 2014, Patsoukis et al. 2015, Pollizzi et al. 2015].

III. Pathologies et altérations du système immunitaire

Le système immunitaire peut être activé anormalement dans certaines pathologies ou situations non physiologiques, dans lesquelles des médicaments immunosuppresseurs sont administrés (**IV. Les médicaments immunosuppresseurs**). Ils sont utilisés dans trois contextes majeurs: les maladies auto-immunes, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) ou après la transplantation d'organes.

La différence entre les pathologies classées comme auto-immunitaires ou auto-inflammatoires n'est pas encore très claire du fait que certaines d'entre elles sont constituées à la fois d'éléments d'auto-immunité et d'auto-inflammation. L'auto-immunité est définie comme l'inflammation contre le soi par altération de la tolérance et la présence d'anticorps contre des auto-antigènes qui affectent le système immunitaire adaptatif. A l'inverse, l'auto-inflammation est déclenchée par des facteurs locaux qui activent le système immunitaire inné (macrophages, neutrophiles) entraînant des lésions tissulaires [McGonagle and McDermott 2006]. Cependant, la plupart des maladies auto-immunes ont une composante inflammatoire plus ou moins importante, de même les maladies inflammatoires ont une composante immunitaire. Pour les maladies auto-inflammatoires, nous nous focaliserons sur les MICI, puisque les médicaments immunosuppresseurs d'intérêt pour le projet sont utilisés principalement dans ce groupe de pathologies.

III.1. Maladies auto-immunes

Le système immunitaire doit être capable de différencier le soi du non-soi. La rupture de tolérance ou auto-immunité apparaît quand il n'est pas compétent pour faire cette différence. Dans ce cas, le système immunitaire attaque d'une façon organe-spécifique ou systémique les propres cellules du corps comme s'ils étaient des pathogènes.

Dans les maladies auto-immunes, les lymphocytes T ou B qui ont des récepteurs contre des antigènes du soi n'ont pas été éliminés par la sélection positive et négative et ils se retrouvent dans les organes lymphoïdes secondaires [Goodnow et al. 2005].

III.1.1. Mécanismes de tolérance

Pour éviter l'attaque des lymphocytes auto-réactifs, il existe différents mécanismes à plusieurs niveaux regroupés sous le terme de tolérance, c'est-à-dire, un défaut de réponse contre un antigène. La tolérance est un état de non-réponse immunitaire vis-à-vis d'un antigène, spécifique de cet antigène. C'est un phénomène actif, induit par un contact préalable avec l'antigène.

Normalement, un organisme est tolérant à ses propres constituants: c'est la tolérance du soi ou auto-tolérance, qui implique les lymphocytes T et, à un moindre degré, les lymphocytes B. Dans un premier temps, il s'agit principalement d'un mécanisme central dans les organes lymphoïdes primaires, désigné sous le terme de tolérance centrale, et ensuite, s'il persiste encore des cellules ou anticorps auto-réactifs, c'est la tolérance périphérique qui est mise en jeu.

- Tolérance centrale

La tolérance centrale basée sur la délétion clonale est le mécanisme primaire principal focalisé sur la réponse immunitaire adaptative qui permet l'élimination des clones de cellules T ou B avant maturation s'ils possèdent des récepteurs qui reconnaissent des antigènes propres. Elle a lieu dans la moelle osseuse pour les cellules B et dans le thymus pour les cellules T (organes lymphoïdes primaires). Les lymphocytes B et T qui portent des BCR ou des TCR potentiellement auto-réactifs sont régulés. Même si la tolérance centrale est très efficace, elle n'élimine pas tous les lymphocytes auto-réactifs. Certains échappent à la délétion clonale thymique soit parce que l'ensemble des auto-antigènes ne sont pas exprimés dans les organes lymphoïdes primaires (autoantigènes séquestrés) soit parce que l'épitope en question n'est pas reconnu avec une avidité suffisante pour entraîner la délétion du clone [Hogquist et al. 2005, Kindt et al. 2007a].

- Tolérance périphérique

La tolérance périphérique (par ignorance ou anergie) est un mécanisme qui se déroule dans les organes lymphoïdes secondaires pour désactiver les lymphocytes B ou T matures auto-réactifs qui ont échappé à la tolérance centrale (**Tableau 3**). L'ignorance, ou indifférence des lymphocytes T, concerne les épitopes présentés par les cellules des tissus qui n'expriment pas de molécules du CMH. L'anergie est un état de non-réponse spécifique induit dans un lymphocyte T par une stimulation antigénique non accompagnée des signaux de co-stimulation délivrés par certaines molécules membranaires des CPA. En l'absence de lymphocytes T auto-réactifs fonctionnels, les lymphocytes B auto-réactifs seront peu activés. Lorsque les lymphocytes B et T auto-réactifs deviennent anergiques, ils ne répondent pas aux signaux d'activation [Kindt et al. 2007a].

Lymphocytes T	Lymphocytes B
• Délétion (centrale, thymique) • Anergie • Suppression • Ignorance	• Délétion (moelle osseuse) • Anergie • Défaut de coopération des lymphocytes T

Tableau 3. Mécanismes de tolérance des lymphocytes T et B.

La tolérance périphérique peut être induite par les cellules Tregs car elles agissent au niveau des tissus lymphoïdes secondaires et dans des sites d'inflammation pour diminuer les réactions auto-immunitaires et supprimer les lymphocytes T auto-réactifs [Rioux and Abbas 2005, Kindt et al. 2007a]. Dans certaines maladies auto-immunes, il a été montré une diminution de l'activité des Tregs [Bolon 2012]. Une inhibition de l'antigène 4 du lymphocyte T CTLA-4 (de l'anglais, cytotoxic

T-lymphocyte-associated protein 4 ou CD152), un récepteur qui inhibe le signal de co-stimulation des cellules T et donc les rend anergiques, a été aussi décrite comme mécanisme de régulation de la tolérance périphérique [Kindt et al. 2007a].

Tous les clones auto-réactifs de lymphocytes B et T qui n'ont pas été détruits par la tolérance centrale ou périphérique sont susceptibles de déclencher des réactions inadaptées contre le soi. Les maladies auto-immunes se déclenchent en raison d'une rupture durable de l'auto-tolérance, résultant d'un échappement à la tolérance des lymphocytes T, permettant de fournir aux lymphocytes B le signal générant la production de grandes quantités d'auto-anticorps pathogènes. Les mécanismes conduisant à une production d'auto-anticorps pathogènes par une rupture durable de l'auto-tolérance sont mal connus. La contribution indiscutable de facteurs génétiques et de facteurs environnementaux ainsi que les résultats obtenus dans les modèles expérimentaux de maladies auto-immunes montrent que cette rupture est multifactorielle selon des mécanismes pouvant s'additionner: similitude d'un antigène exogène avec un antigène du soi; expression anormale des molécules CMH de classe II à la surface des cellules; hyperréactivité des lymphocytes T/B suite à une infection par le virus d'Epstein-Barr (EBV, de l'anglais Epstein-Barr virus) ou un traitement par IL-2; dysfonctionnement des cellules T régulatrices [Marrack et al. 2001, Kindt et al. 2007a, Costenbader et al. 2012].

III.1.2. Maladies auto-immunes

Les maladies auto-immunes sont un problème majeur en santé humaine, puisqu'on les situe juste après les cancers et les maladies cardio-vasculaires. La plupart n'ont pas de traitement curatif et leur chronicité est associée à une forte morbidité et mortalité. Elles se déclenchent souvent chez les jeunes adultes avec une prévalence comprise entre 5-10% dans la population, ce qui correspond à plus de 20 millions de cas aux États-Unis [Rioux and Abbas 2005, Balagué et al. 2009, Bolon 2012, Hirsch and Ponda 2015, Rose 2015]. Selon l'Institut National de Santé (NIH, de l'anglais, National Institutes of Health), l'impact économique et social de ces maladies est majeur avec un coût direct annuel de 100 milliards de dollars aux États-Unis [Balagué et al. 2009, Hirsch and Ponda 2015].

Plus de 80 maladies auto-immunes différentes ont été décrites [Bluestone et al. 2015]. De façon générale, les maladies auto-immunes s'observent préférentiellement chez la femme. En effet, leur prévalence est 10 fois supérieure (>75%) préférentiellement en période de procréation par rapport à l'homme. Une hypothèse proposée suggère que la nature des gènes localisés sur le chromosome X, incluant des gènes liés au sexe et à la réponse immunitaire (essentiels pour l'entretien de la tolérance immunitaire), peut expliquer la différence de prévalence entre les deux sexes [Invernizzi and Gershwin 2009, Wahren-Herlenius and Dörner 2013]. De plus le rôle parfois aggravant de la grossesse ou de traitements inducteurs de l'ovulation renforce cette hypothèse [Bolon 2012].

Les maladies auto-immunes sont généralement multifactorielles associant une susceptibilité individuelle d'origine génétique (la plupart du temps ce sont des maladies polygéniques) ou endocrinienne comme le statut hormonal, à des facteurs environnementaux comme le contact avec des pathogènes ou des xénobiotiques [Bolon 2012, Bluestone et al. 2015]. Des études épidémiologiques ont montré une augmentation des maladies auto-immunes dans les pays industrialisés, probablement en lien avec des facteurs environnementaux, impliquant non seulement des modifications d'exposition environnementale mais aussi une amélioration de l'hygiène, qui en diminuant le contact avec des agents pathogènes et des parasites, peut ainsi favoriser les réactions du système immunitaire vis-à-vis des auto-antigènes [Bolon 2012, Rose 2015].

- Classification des maladies auto-immunes

On distingue schématiquement deux types de maladies auto-immunes:

i) les maladies auto-immunes spécifiques d'organe
ii) les maladies auto-immunes systémiques, non spécifiques d'organe

De plus, elles peuvent être caractérisées selon qu'elles sont causées par des autoanticorps ou par des lymphocytes T.

Dans les maladies auto-immunes spécifiques d'organes, la réaction auto-immunitaire ne touche qu'un seul organe. Les anémies auto-immunitaires, le diabète de type I, la maladie de Graves et la myasthénie (*myasthenia gravis*) en sont quelques exemples.

Dans les maladies auto-immunes systémiques, la réaction immunitaire est dirigée contre plusieurs antigènes affectant plusieurs organes et tissus avec une hyperactivité des lymphocytes T et B. Dans ce groupe on retrouvera le lupus érythémateux disséminé (LED), la sclérose en plaques (SEP) et la polyarthrite rhumatoïde (PR) [Kindt et al. 2007a].

- Étiologie des maladies auto-immunes

Certaines maladies auto-immunes sont monogéniques, soit la conséquence de mutations dans un seul gène, mais la grande majorité est polygénique et multifactorielle (environnement, infections) [Bolon 2012]. Grâce au séquençage complet du génome humain, de nombreux gènes impliqués dans les maladies auto-immunes ont été identifiés [Invernizzi and Gershwin 2009]. Certains polymorphismes constituent des facteurs de risque dans le développement des maladies auto-immunes. De même certains haplotypes pour des antigènes des leucocytes humains HLA (de l'anglais, human leukocyte antigen) ont été associés avec la survenue de maladies auto-immunes. Par exemple, l'HLA-DR2 avec la SEP et le LED et l'HLA-DR3 avec le diabète de type 1, la myasthénie ou le LED.

  - Les maladies auto-immunes monogéniques

L'étude des maladies auto-immunes monogéniques a permis de mieux comprendre les mécanismes de tolérance. En outre, des modèles murins de knock-out (KO) ou par mutagénèse

ont permis d'identifier des gènes impliqués dans le développement des maladies auto-immunes ainsi que des gènes à l'origine d'une maladie humaine monogénique (**Tableau 4**).

Gène	Maladie humaine	Mécanisme d'auto-immunité
AIRE	APS-1	Diminution de l'expression d'auto-antigènes dans le thymus. Sélection négative déficiente
FOXP3	IPEX	Diminution de la production de Treg $CD4^+CD25^+$
FAS, FASL	ALPS	Échec de l'apoptose sur les cellules T et B auto-réactives

Tableau 4. Gènes associés à des maladies auto-immunes monogéniques.
AIRE: auto-immune regulator; ALPS: syndrome lymphoprolifératif avec auto-immunité; APS-1: syndrome auto-immun sévère; FOXP3: forkhead box protein 3; IPEX: syndrome d'immunodérégulation, polyendocrinopathie, entéropathie auto-immune lié au chromosome X. D'après [Rioux and Abbas 2005, McGonagle and McDermott 2006].

A titre d'exemple, des mutations dans le gène *AIRE* (de l'anglais, Auto-Immune REgulator) codant un facteur de transcription exprimé dans le thymus ont été identifiées dans le syndrome auto-immun sévère APS-1 (de l'anglais, autoimmune polyendocrine syndrome). Des expériences de KO du gène homologue chez la souris ont montré que le gène *AIRE* est important pour l'expression des auto-antigènes, peptides spécifiques des tissus périphériques largement exprimés par les cellules stromales présentes dans la zone médullaire du thymus. En conséquence, un défaut fonctionnel du gène *AIRE* va aboutir à la diminution de l'expression des auto-antigènes dans le thymus. Les lymphocytes T reconnaissant ces auto-antigènes échappent alors à la sélection négative au cours de la tolérance centrale et une fois qu'ils ont quitté les organes lymphoïdes centraux, ils peuvent léser les tissus périphériques qui présentent ces auto-antigènes à leur surface [Rioux and Abbas 2005, Cho and Gregersen 2011, Bluestone et al. 2015].

Les cellules Tregs $CD4^+CD25^+$ contrôlent les réponses immunitaires en exerçant des fonctions suppressives sur la prolifération des lymphocytes T effecteurs. Les Tregs expriment fortement FOXP3, un facteur de transcription nécessaire pour la différentiation des cellules Tregs, dont le gène se situe sur le chromosome X. Des expériences de KO de FOXP3 chez la souris ont mis en évidence le développement de maladies auto-immunes systémiques par la perte de fonction des Tregs. Chez l'homme, le syndrome IPEX, une maladie auto-immunitaire rare, est la conséquence des mutations dans le gène *FOXP3*, suggérant un rôle crucial des Tregs dans le développement des maladies auto-immunes [Rioux and Abbas 2005, Cho and Gregersen 2011].

L'apoptose des lymphocytes auto-réactifs est une étape essentielle dans la maturation des lymphocytes B et T. La protéine transmembranaire Fas (ou APO-1, CD95) fait partie de la famille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale (TNF, de l'anglais, tumor necrosis factor) impliqué dans le déclenchement de l'apoptose des lymphocytes T et B qui reconnaissent des auto-antigènes. Il a été montré que des mutations dans le gène Fas ont comme résultat un phénotype d'auto-immunité. Le syndrome lymphoprolifératif avec auto-immunité (ALPS, de l'anglais

autoimmune lymphoproliferative syndrome) présente une apoptose déficiente causée par des mutations du gène Fas [Rioux and Abbas 2005].

Ces trois exemples, l'APS-1, l'IPEX et le syndrome lymphoprolifératif avec auto-immunité, représentent des maladies monogéniques auto-immunes rares comportant très peu de composantes d'auto-inflammation [McGonagle and McDermott 2006].

- Les maladies auto-immunes multifactorielles

La grande majorité des maladies auto-immunes sont polygéniques, comme la polyarthrite rhumatoïde (PR), la maladie cœliaque, la myasthénie, le diabète de type I, le LED et le syndrome de Gougerot-Sjögren, entre autres [McGonagle and McDermott 2006].

Actuellement, les études se focalisent sur l'influence de certains variants génétiques dans le développement de diverses maladies auto-immunes. Par exemple, les porteurs de variants de CTLA-4, nécessaire pour induire l'anergie des cellules T, ont montré une susceptibilité accrue pour le développement du diabète de type 1 ou la maladie de Graves. CTLA-4 est un récepteur qui reconnaît et inhibe les molécules de co-stimulation CD80 et CD86 pour induire une diminution de l'activation des lymphocytes et soutenir une anergie au cours du temps. Puisque l'anergie des lymphocytes T est nécessaire dans les étapes de tolérance pour contrôler les lymphocytes T auto-réactifs, des polymorphismes génétiques modulant l'épissage alternatif de CTLA-4 et non fonctionnels pourraient altérer l'anergie des lymphocytes T [Rioux and Abbas 2005].

Les maladies auto-immunes sont d'une grande complexité car chaque maladie a un mécanisme pathologique différent et c'est une combinaison de facteurs qui peut les déclencher.

Les agents infectieux (pathogènes comme l'EBV), le rayonnement ultraviolet, des composés chimiques ou médicaments, des polluants environnementaux, l'état hormonal (par exemple, une grossesse) et aussi des facteurs liés au comportement comme le tabac ou le régime alimentaire peuvent moduler les réponses immunitaires [Costenbader et al. 2012].

• Prise en charge thérapeutique des maladies auto-immunes

Le traitement des maladies auto-immunes fait souvent appel à une stratégie d'immunosuppression non spécifique associant habituellement la corticothérapie et les antimitotiques. Ces traitements ne sont pas dénués d'effets iatrogènes, qui limitent leurs indications aux maladies auto-immunes dites sévères. Ces stratégies thérapeutiques ont pour but d'agir sélectivement sur les lymphocytes suractivés ou mieux sur les clones autoréactifs.

Le traitement des maladies auto-immunes a plusieurs objectifs: prévenir les poussées de la maladie, s'opposer à l'évolutivité des atteintes viscérales, préserver l'insertion socio-professionnelle et guérir la maladie tout en évitant les effets indésirables des traitements. Le traitement immunologique des maladies auto-immunes repose sur trois points: supprimer les auto-anticorps pathogènes (plasmaphérèse), éviter leur production en agissant sur l'activation des

lymphocytes et sur la synthèse de cytokines (immunosuppresseurs) et, de façon plus subtile, modifier la réponse immune pour la rendre non pathogène (principe de l'immunomodulation).

Les traitements immunosuppresseurs (**IV. Les médicaments immunosuppresseurs**) même s'ils ne sont pas très spécifiques, ont pour but de diminuer la prolifération des lymphocytes (6-mercaptopurine, acide mycophénolique, méthotrexate, rapamycine) ou d'inhiber l'activation des cellules T (tacrolimus). Ce sont des traitements non-spécifiques administrés à vie. Ils induisent une immunosuppression généralisée, associée à une augmentation du risque d'infections et de cancer, ou encore d'hépatotoxicité [Hirsch and Ponda 2015].

Dans le cas de l'immunomodulation, le traitement repose sur un effet inhibiteur direct sur les lymphocytes par le biais de CTLA4, en modifiant l'équilibre Th1/Th2 par l'IL-44 ou en inhibant l'action cytotoxique du TNF-α par des anticorps anti-TNF-α. Cependant, ces thérapies restent très coûteuses et ne sont pas adaptées à tous les patients [Balagué et al. 2009].

III.2. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Les MICI sont des maladies idiopathiques très invalidantes qui incluent la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse (ou rectocolite hémorragique, RCH) [McGonagle and McDermott 2006, Abraham and Cho 2009, Matricon 2010]. Les MICI sont caractérisées par une inflammation chronique et intermittente de l'appareil digestif qui se manifeste par des douleurs abdominales, de la diarrhée et éventuellement de la fièvre [Loftus 2004, Matricon 2010, Molodecky et al. 2012]. Cette affection peut atteindre la totalité du tube digestif mais touche en priorité le grêle et le côlon. Elles sont à l'origine d'une morbidité importante sans augmentation significative de la mortalité [Hanauer 2006, Matricon 2010].

Les MICI touchent principalement les pays occidentaux aux États-Unis et en Europe. Aux États-Unis, ces maladies affectent entre 1 et 2 millions d'américains, tandis qu'en Europe il y a environ 2,5 millions de patients, dont 200 000 en France [Loftus 2004, Hanauer 2006, Abraham and Cho 2009, Molodecky et al. 2012, Kaistha and Levine 2014].

Les MICI sont des pathologies de l'adulte jeune et le diagnostic survient généralement entre 15 et 30 ans, avec 10% des patients âgés de moins de 18 ans [Hanauer 2006, Abraham and Cho 2009, Kaistha and Levine 2014]. Il existe un second pic de fréquence entre 50 et 80 ans. Les deux sexes sont également atteints. De plus, chaque année, 60 000 nouveaux cas de la RCH et 30 000 pour la maladie de Crohn sont diagnostiqués en Europe [Loftus 2004].

III.2.1. Etiologie

Les MICI sont considérées comme des maladies multifactorielles associant vraisemblablement des facteurs de risque environnementaux, génétiques et une dérégulation immunologique par exposition aux microorganismes. Les interactions entre le système immunitaire des muqueuses et

le microbiote intestinal restent mal connues, ce qui rend difficile la compréhension des mécanismes physio-pathologiques [Baumgart and Carding 2007, Strober et al. 2007].

Dans la pathogénèse des MICI, on distingue classiquement 4 étapes (**Figure 11**). La première étape est constituée par la susceptibilité génétique et les facteurs environnementaux qui peuvent perturber le fonctionnement de la barrière intestinale. Les microorganismes (pathogènes et commensaux) vont migrer à travers la barrière avec une activation du système immunitaire. Cela aboutit à la phase 2, c'est-à-dire, à une activation aiguë intestinale. Si cette activation du système immunitaire est maintenue *via* la production des médiateurs pro-inflammatoires, une dérégulation des Tregs et une activation des cellules T effectrices, il y aura une inflammation chronique (phase 3). Finalement, si cette chronicité s'installe durablement, le tissu sera détruit et des complications cliniques intestinales et extra-intestinales apparaîtront (phase 4) [Neurath 2014].

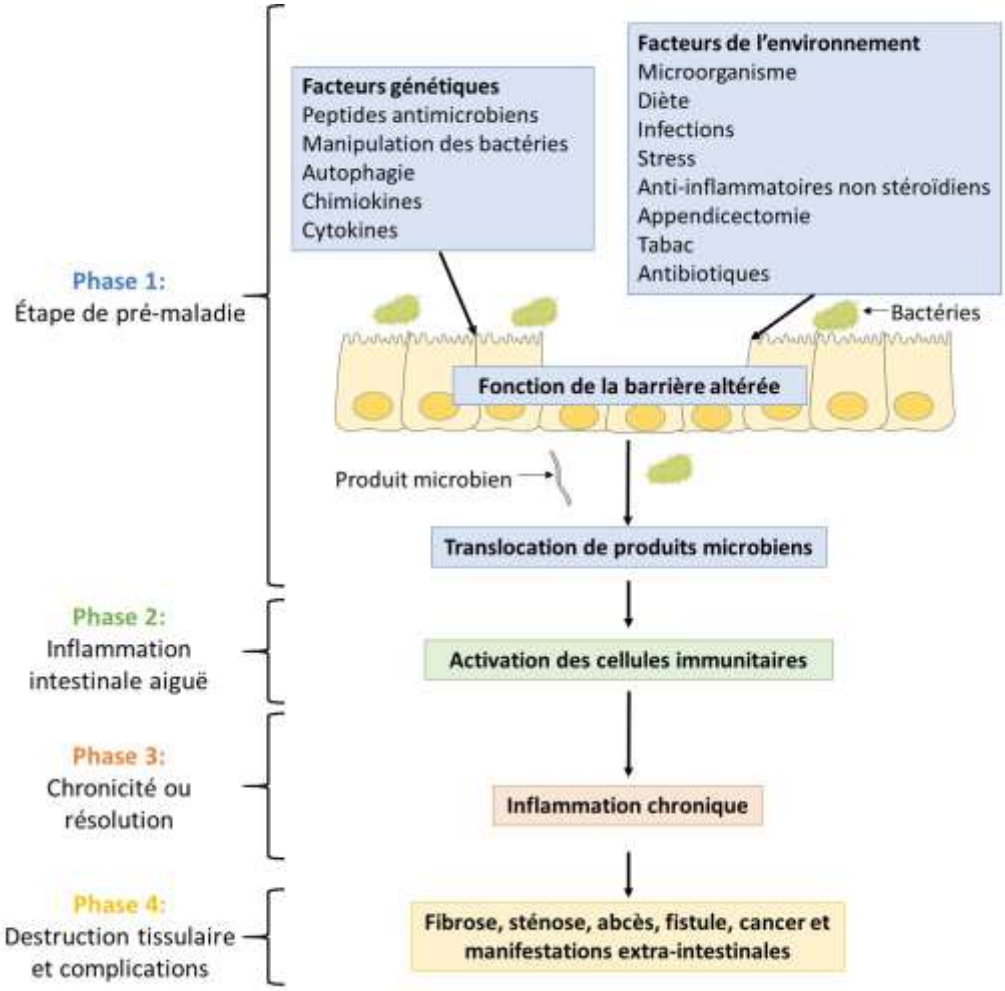


Figure 11. Etapes de la progression au cours de la pathogénèse des MICI.
Des facteurs génétiques et environnementaux peuvent altérer la fonction de la barrière, avec passage transépithélial de produits microbiens. Une activation des cellules immunitaires suivie d'une inflammation chronique peut aboutir à la destruction tissulaire avec des complications. Adaptée de: [Neurath 2014].

- Facteurs environnementaux

Les données épidémiologiques montrent une augmentation de la prévalence des MICI dans les régions développées, suggérant que le style de vie occidental lié à des changements des régimes alimentaires, le tabagisme, la pollution et les produits chimiques ont une part importante dans le risque de développer des MICI [Hanauer 2006]. Comme pour l'asthme et certaines maladies auto-immunes, il existe une association entre l'hygiène publique et le développement des MICI. L'amélioration du niveau de vie dans les pays industrialisés en réduisant l'exposition aux agents infectieux dans l'enfance pourrait favoriser la survenue des MICI par fragilisation du système immunitaire et/ou modification du microbiote [Hanauer 2006, Baumgart and Carding 2007]. Les changements dans les habitudes alimentaires, l'usage abusif d'antibiotiques et les modifications du microbiote (par exemple, élimination des helminthes intestinaux) ont probablement contribué à une augmentation de la prévalence des MICI [Abraham and Cho 2009, Cho and Gregersen 2011].

Cependant, le facteur le plus important pour les MICI est le tabac, décrit comme un facteur de risque et de sévérité pour la maladie de Crohn, alors qu'il représente un facteur protecteur vis-à-vis de la RCH [Loftus 2004, Hanauer 2006, Abraham and Cho 2009, Kaistha and Levine 2014]. Certaines études ont montré un risque deux fois plus élevé de développer la maladie de Crohn chez les fumeurs [Loftus 2004].

L'appendicectomie serait également un facteur de risque pour la maladie de Crohn mais un facteur protecteur pour la RCH même si les mécanismes ne sont pas encore élucidés [Loftus 2004, Baumgart and Carding 2007]. De plus, d'autres facteurs ont été identifiés mais avec un impact relativement faible [Loftus 2004, Hanauer 2006]. Par exemple, les contraceptifs oraux pourraient augmenter le risque de développer les MICI [Loftus 2004].

- Facteurs génétiques

Des études chez des jumeaux monozygotes ont montré un taux de concordance dans le développement des MICI beaucoup plus élevé que chez les dizygotes [Hanauer 2006, Baumgart and Carding 2007]. De plus, la présence d'un malade atteint de la maladie de Crohn ou de RCH dans une famille est associée à une augmentation du risque de survenue chez les autres membres de la famille (parenté au premier et deuxième degré) [Baumgart and Carding 2007]. La contribution génétique semble plus importante dans la maladie de Crohn que dans la RCH bien que ces pathologies soient toutes les deux polygéniques et multifactorielles [Baumgart and Carding 2007].

Dans la maladie de Crohn, plusieurs gènes impliqués dans son développement ont été identifiés, notamment les gènes *NOD2/CARD15* (de l'anglais, nucleotide-binding oligomerization domain 2 ou CARD15, de l'anglais, caspase recruitment domain-containing protein 15), l'*ATG16L1* (de l'anglais, autophagy-related, 16-like) et l'*IRGM* (de l'anglais, immunity-related GTPase M protein), qui contribuent aux voies impliquées dans la réponse du système immunitaire innée (**Tableau 5**) [Abraham and Cho 2009]. De plus, l'*ATG16L1* et l'*IRGM* codent pour des protéines de l'autophagie,

processus qui régule la dégradation des composants cellulaires incluant les pathogènes [Cho 2008, Abraham and Cho 2009, Khor et al. 2011, Kaistha and Levine 2014].

Dans la RCH et la maladie de Crohn, les gènes qui codent pour le récepteur à l'IL-23, l'*IL-23R*, représentent également des facteurs de susceptibilité pour développer ces maladies. L'IL-23R favorise la différenciation et le maintien des Th17 [Cho 2008, Abraham and Cho 2009, Matricon 2010, Kaistha and Levine 2014].

Gène	Rôle	Maladie associée
NOD2/CARD15	Senseur intracellulaire des peptidoglycanes des bactéries pour activer les voies de signalisation	MC
ATG16L1	Composant des complexes dans l'autophagie	MC
IRGM	Rôle dans l'autophagie	MC
Il-23R	Différenciation et maintenance des Th17	MC, RCH

Tableau 5. Principaux gènes de susceptibilité pour les MICI.
ATG16L1: autophagy-related, 16-like; IRGM: immunity-related GTPase M protein; MC: maladie de Crohn; NOD2/CARD15: nucleotide-binding oligomerization domain 2; RCH: rectocolite hémorragique. De: [Cho 2008, Abraham and Cho 2009, Matricon 2010, Kaistha and Levine 2014].

Le gène le plus étudié *NOD2/CARD15* code pour une protéine comportant au moins 4 domaines, dont un domaine incluant des séquences répétées riches en leucine permettant l'interaction avec des composants bactériens dont le lipopolysaccharide (LPS), et deux domaines CARD (de l'anglais, caspase recruitment domain) servant d'effecteurs pour l'activation de l'apoptose et la voie de NF-κB [Bouma and Strober 2003].

NOD2/CARD15 est principalement exprimé dans les macrophages, les cellules dendritiques, épithéliales et endothéliales et joue le rôle de «senseur intracellulaire» des peptidoglycanes (composants de la paroi des bactéries) [Bouma and Strober 2003, Hanauer 2006, Abraham and Cho 2009, Cho and Gregersen 2011]. Le gène *NOD2/CARD15* est activé sous l'action du muramyl dipeptide (MDP), un composant bioactif des peptidoglycanes retrouvé dans les bactéries Gram positives et négatives [Cho 2008].

Les mutations associées à une diminution de l'activité de NOD2 ont pour conséquence l'absence de reconnaissance de son ligand, étape indispensable à l'activation du facteur de transcription NF-κB. Les mutations observées dans la maladie de Crohn sont pour la plupart situées dans la région codant pour la portion distale de la protéine NOD2 et en particulier la région riche en leucine. Ces mutations sont présentes chez près de la moitié des malades atteints de maladie de Crohn, qu'il s'agisse de cas familiaux ou sporadiques. Elles ne sont au contraire présentes que chez 10 à 20% des patients atteints de RCH. Plus de 30 mutations ayant potentiellement un effet biologique ont été répertoriées et se répartissent sur la plus grande partie du gène. La plupart d'entre elles sont rares et ne concernent qu'un petit nombre de malades (mutations privées). A l'inverse, il existe

trois mutations fréquentes associées à la maladie de Crohn (R702W, G908R et L1007fsinsC) représentant près de 80% de l'ensemble des mutations répertoriées [Hanauer 2006, Hugot et al. 2007, Cho 2008, Matricon 2010]. Cependant, le mécanisme exact par lequel NOD2 va influencer le développement de la maladie de Crohn, reste inconnu [Baumgart and Carding 2007, Abraham and Cho 2009]. Enfin, la valeur diagnostique du génotypage de *CARD15/NOD2* n'est à envisager aujourd'hui qu'en complément des outils classiques que sont la clinique, l'endoscopie, l'histologie, la biologie ou la radiologie.

- Dérégulation du système immunitaire par exposition aux microorganismes

Les MICI sont caractérisées par une dérégulation du système immunitaire au niveau de la muqueuse intestinale liée à des expositions aux microbes. Une des hypothèses évoquées est une réponse immunitaire exacerbée vis-à-vis de composants physiologiques dans le compartiment luminal. Dans les MICI, il existe une altération de la tolérance à l'exposition des bactéries commensales, avec pour conséquence une réponse inflammatoire et une destruction tissulaire chronique [Hanauer 2006].

Si la découverte du gène *CARD15/NOD2* a orienté la physiopathologie de la maladie de Crohn vers l'immunité innée, certains gènes du système immunitaire adaptatif ont été aussi associés à la susceptibilité vis-à-vis des MICI. A titre d'exemple, on peut citer la voie de l'IL-23 produite par les lymphocytes Th17, qui va réguler la défense contre les microbes et l'inflammation intestinale [Cho 2008, Abraham and Cho 2009].

III.2.2. Immunobiologie des MICI

La défense immunitaire contre les microbes intestinaux est défaillante dans les MICI à trois niveaux: (1) la barrière muqueuse épithéliale et (2) la réponse immunitaire innée ou (3) adaptative de l'hôte.

- Perturbation de la barrière épithéliale

Un mécanisme impliquant une augmentation de la perméabilité de la barrière épithéliale a été proposé. Dans cette situation, les composés issus des bactéries franchissent la barrière intestinale, vont activer les cellules du système immunitaire et être à l'origine d'une réponse inflammatoire. Sachant que le lumen contient 10^{14} organismes de plus de 500 espèces différentes, une barrière efficace est nécessaire pour l'homéostasie du système digestif [Hanauer 2006].

La muqueuse intestinale offre une très grande surface d'échanges avec l'extérieur, notamment pour l'absorption des nutriments. Elle héberge aussi un système de défense complexe permettant une protection vis-à-vis de nombreux agents pathogènes auxquels elle est exposée. La barrière épithéliale est la première ligne de défense physique et chimique entre le monde extérieur et le système immunitaire. L'épithélium intestinal est en effet l'interface entre le microbiote intestinal et le tissu lymphoïde associé [Abraham and Cho 2009, Khor et al. 2011].

La composante physique est constituée de deux éléments principaux: i) les jonctions serrées qui sont des jonctions étanches entre les cellules épithéliales empêchant la diffusion de molécules et de pathogènes, et ii) la couche de mucus qui est fabriquée par les cellules caliciformes. L'épaisseur de la couche de mucus varie le long du tube digestif et est maximale dans l'iléon terminal et surtout le côlon [CDU-HGE 2014]. Dans les MICI il existe une altération de la cohésion et de l'étanchéité de la muqueuse intestinale. En effet, le mucus protecteur est diminué et les protéines qui assurent les jonctions serrées sont en quantité réduite [Matricon 2010].

La composante chimique est constituée principalement de molécules antimicrobiennes (les défensines par exemple) qui détruisent ou inhibent la croissance des bactéries et/ou levures [CDU-HGE 2014].

On rencontre 4 types cellulaires dans l'épithélium intestinal: les entérocytes, les cellules caliciformes, les cellules neuroendocrines (sécrétrices d'hormones) et au niveau de l'iléon, les cellules ayant un rôle dans les défenses immunitaires (cellules de Paneth et cellules «M», en anglais, microfold cells) (**Figure 12**). Les cellules épithéliales de l'intestin sont disposées en monocouche, polarisées et ont une activité sécrétoire importante avec production de mucus, permettant la fixation des microbes. Le flux des nutriments (ou bactéries) peut suivre un trafic paracellulaire, entre les cellules et contrôlé par les jonctions serrées, ou transcellulaire, *via* des transporteurs ou des pompes spécifiques [Baumgart and Carding 2007, Abraham and Cho 2009].

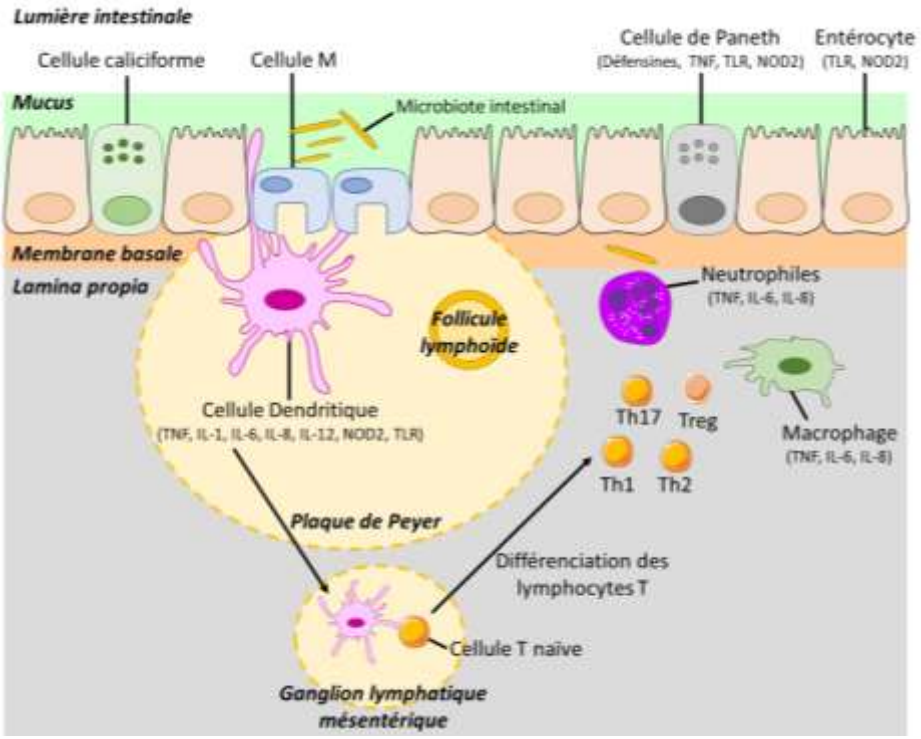


Figure 12. Cellules impliquées dans les mécanismes de défense de la barrière épithéliale intestinale.

Dans la barrière épithéliale, les entérocytes et les cellules de Paneth sécrètent différentes molécules pour permettre la protection contre les microorganismes, avec les cellules M

(microfold) et les cellules caliciformes. Les cellules dendritiques font le lien entre la barrière épithéliale et les plaques de Peyer, pour ensuite migrer vers les ganglions lymphatiques mésentériques pour favoriser la différenciation et la prolifération des lymphocytes T en Th1, Th2, Th17 ou Tregs. Enfin, des neutrophiles et des macrophages sont également présents pour empêcher la survie des bactéries pathogènes. Adaptée de: [Baumgart and Carding 2007, Cho 2008, Matricon 2010, Kaistha and Levine 2014]

Les entérocytes sont les cellules les plus nombreuses et sont responsables de la fonction d'absorption intestinale. Les cellules caliciformes (en anglais, Globet cells) régulent la production de mucus et d'autres facteurs indispensables pour la réparation de l'épithélium [Cho 2008, Abraham and Cho 2009, Khor et al. 2011]. Enfin, l'épithélium contient les cellules M qui sont en contact avec les plaques de Peyer correspondant à des agrégats de follicules lymphoïdes riches en lymphocytes B et T et assurent l'endocytose des antigènes endoluminaux et leur transfert aux cellules dendritiques qui les présentent aux lymphocytes T [Cho 2008]. Les cellules de Paneth situées au fond des cryptes intestinales ont un rôle important dans les mécanismes de défense innée de l'intestin grâce à la production de plusieurs molécules ayant des propriétés anti-microbiennes [Baumgart and Carding 2007], notamment les défensines pour contrôler la composition du microbiote [Khor et al. 2011].

Les cellules épithéliales possèdent des familles de récepteurs extracellulaires ou intracellulaires de reconnaissance de motifs moléculaires propres aux micro-organismes (bactéries, champignons, parasites et virus) ou PRR qui se lient notamment aux LPS, aux peptidoglycanes, à l'ARN simple ou double brin des bactéries. Comme nous le verrons plus loin, ces récepteurs sont aussi exprimés dans les cellules présentatrices d'antigène et les cellules de l'immunité innée. Parmi les PRR, l'activation des récepteurs extracellulaires ou transmembranaires de type Toll TLR (de l'anglais, toll-like receptor), ou des récepteurs NOD intracellulaires induit une cascade de signalisation intracellulaire conduisant à l'activation et/ou la modulation de la réponse immunitaire. Au niveau des cellules épithéliales intestinales, l'activation des PRRs induit notamment la production de peptides antimicrobiens, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et le recrutement de polynucléaires neutrophiles et de macrophages [Bouma and Strober 2003, Baumgart and Carding 2007, Matricon 2010, CDU-HGE 2014].

Dans les MICI, il y a un dysfonctionnement de la barrière qui devient davantage perméable, en raison d'un défaut de production des peptides antimicrobiens [Baumgart and Carding 2007, Abraham and Cho 2009]. De plus, les cellules épithéliales et les cellules de Paneth ont une modification d'expression des TLR avec en particulier une augmentation des récepteurs NOD2, ce qui peut favoriser une inflammation chronique par une réponse exacerbée vis-à-vis du microbiote [Baumgart and Carding 2007].

- Dérégulation de la réponse du système immunitaire inné

L'affaiblissement de la barrière intestinale aura pour conséquence une augmentation du contact entre les bactéries commensales et le système immunitaire, entraînant une perte de tolérance à la

flore commensale et une activation des cellules sentinelles de l'immunité innée, les CD. Les CD, présentes dans la *lamina propria* sont à l'interface entre les cellules épithéliales intestinales et les lymphocytes T. Un sous-type de CD est capable de détecter les antigènes directement dans la lumière intestinale et peut ouvrir les jonctions serrées à la partie apicale de l'épithélium pour étirer des dendrites dans la lumière et capturer les bactéries. Les CD vont promouvoir la différenciation des cellules Th0 $CD4^+$ (naïves) en Tregs pour garantir la tolérance à la flore commensale. Elles expriment tous les récepteurs TLR et les NOD, et leur activation est à l'origine de la production de cytokines pro-inflammatoires. Les CD activées favorisent également la différenciation des lymphocytes T effecteurs Th1, Th2 et Th17 dans les organes lymphoïdes secondaires de l'intestin, comme les plaques de Peyer [Baumgart and Carding 2007, Cho 2008, Abraham and Cho 2009, Matricon 2010, CDU-HGE 2014]. L'équilibre entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires va aboutir à un mélange de différentes sous-populations de cellules T $CD4^+$ [Cho 2008, Abraham and Cho 2009, Matricon 2010].

Dans les MICI, une activation excessive des CD va entraîner une forte différenciation des lymphocytes T naïfs en effecteurs de type $CD4^+$ et $CD8^+$, mais aussi d'autres cellules effectrices tels que les NK avec une diminution de production des Tregs. Le défaut de lymphocytes Tregs participe au développement d'une perte de tolérance vis-à-vis de la flore commensale qui entretient le processus inflammatoire [Matricon 2010]. L'excès d'activation des CD dans les MICI semble être principalement dû à des anomalies notamment d'origine génétique (avec les variantes délétères des gènes TLR 1, 2, 4 et 6 et NOD2) induisant un dysfonctionnement des récepteurs TLR et NOD qui détectent les composants bactériens [Baumgart and Carding 2007, Abraham and Cho 2009, Matricon 2010].

- Dérégulation de la réponse du système immunitaire adaptatif

Le tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale inclut les lymphocytes T, B, granulocytes, mastocytes et NK, localisés dans le tissu connectif de la *lamina propria*. Ces cellules sont finement régulées pour être tolérantes vis-à-vis des bactéries commensales ou pour induire une réponse inflammatoire face aux bactéries pathogènes [Abraham and Cho 2009].

Les anomalies dans la perméabilité de la barrière épithéliale et dans le système immunitaire inné par une hyper-activation des cellules dendritiques induit, en conséquence, une dérégulation de l'activation et la différenciation des cellules du système immunitaire adaptatif.

Dans les MICI, l'inflammation résulte d'une dérégulation de la balance entre les Tregs et les cellules T effectrices, Th1 et Th17 (dépendantes de la présence de l'IL-12 et l'IL-23, respectivement) pour la maladie de Crohn et Th2 (induites par l'IL-4) dans la RCH [Bouma and Strober 2003, Baumgart and Carding 2007, Abraham and Cho 2009, Matricon 2010, Neurath 2014].

Les CD «hyper-activées» sécrètent des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-23 et le TGF-β qui induisent la différenciation en Th17, qui produisent à leur tour la cytokine pro-inflammatoire IL-17

et contribuent à la prédominance des populations effectrices sur les populations régulatrices dans la maladie de Crohn [Abraham and Cho 2009, Matricon 2010, Khor et al. 2011, Neurath 2014]. L'existence d'associations entre des variants génétiques de l'*IL-23R* et la survenue des MICI a permis de mettre en évidence le rôle d'IL-23R, qui active la voie de signalisation JAK-STAT, comme médiateur potentiel de l'inflammation dans ces pathologies [Cho 2008, Abraham and Cho 2009, Matricon 2010]. L'hypothèse évoquée est que la voie de signalisation de l'IL-23R provoquerait un état inflammatoire suite à un déséquilibre entre Tregs et Th17, grâce à la survie et à l'expansion clonale des Th17 (pro-inflammatoires) et à une diminution des Tregs (anti-inflammatoires) [Cho 2008, Matricon 2010]. En accord avec cette hypothèse, les travaux d'Eastaff-Leung *et al*. ont montré qu'une diminution des Tregs avec une augmentation des Th17 en sang périphérique s'accompagne d'une production de cytokines pro-inflammatoires permettant la génération en continu des Th17 chez les patients atteints de la maladie de Crohn [Eastaff-Leung et al. 2010].

En plus d'être associées à une réponse cellulaire *via* les lymphocytes T, les MICI sont aussi associées à une réponse humorale par une infiltration des lymphocytes B produits dans des nodules lymphoïdes isolés ou dans les plaques de Peyer. Les lymphocytes B activés produisent une quantité importante d'auto-anticorps dirigés contre les antigènes des bactéries commensales, ce qui entretient l'inflammation de la muqueuse [Matricon 2010].

Tous ces évènements aboutissent à un afflux anormal des cellules immunitaires vers la muqueuse intestinale avec relargage local de cytokines pro-inflammatoires et de molécules chimio-attractives. L'accumulation de ces médiateurs de l'inflammation dans la muqueuse provoque les lésions tissulaires et conduit à des interactions neuro-immunitaires provoquant l'activation des afférences intestinales à l'origine des douleurs abdominales consécutives à l'inflammation avec des implications cliniques importantes [Baumgart and Carding 2007, Matricon 2010].

III.2.3. Implications cliniques

La maladie de Crohn implique une inflammation transmurale qui peut compromettre l'ensemble du tube digestif d'une façon discontinue (de la bouche à l'anus) mais qui est généralement localisée au niveau de l'iléon et du côlon. Cependant, la RCH est une inflammation de la surface des muqueuses recto-coliques sans interruption [Abraham and Cho 2009, Matricon 2010, Kaistha and Levine 2014].

L'inflammation de la muqueuse est à l'origine d'une symptomatologie importante avant le diagnostic comme les diarrhées chroniques et sanglantes (le plus commun), les douleurs abdominales aiguës, la perte de poids, les troubles digestifs, les fissures ou l'abcès péri-anal, entraînant une altération de la qualité de vie [Abraham and Cho 2009, Assche et al. 2010, Kaistha and Levine 2014].

Les patients atteints de la RCH ou de la maladie de Crohn présentent un risque accru de cancer colorectal, notamment lorsque les lésions sont présentes au niveau du côlon [Kirschner 1998, Kaistha and Levine 2014].

Les manifestations extra-intestinales sont observées entre 25 et 40% des patients atteints de la RCH et de la maladie de Crohn, certains patients vont même les développer avant les premiers symptômes spécifiques des MICI. Elles peuvent toucher presque tous les organes, l'appareil locomoteur, dermatologique, hépato-pancréato-biliaire, oculaire, rénal et pulmonaire [Assche et al. 2010, Levine and Burakoff 2011]. Dans l'appareil locomoteur, les patients peuvent développer des arthrites et de l'ostéoporose, qui peuvent survenir sous l'influence de différents facteurs: le traitement par corticostéroïdes, une réduction de l'activité physique, une altération de la réabsorption osseuse par les cytokines (IL-1, IL-6, TNF-α), une malabsorption rénale de calcium et de magnésium (liée à une intolérance au lactose), un index de masse corporelle (IMC) diminué, une diminution des concentrations d'albumine et enfin, une résorption dans l'iléon [Rothfuss et al. 2006, Levine and Burakoff 2011].

Les traitements médicamenteux au long cours peuvent induire des pancréatites aiguës et chroniques, des hépatotoxicités et des troubles du système rénal [Levine and Burakoff 2011].

III.2.4. Prise en charge thérapeutique des MICI

Le choix d'un traitement est toujours conditionné par la balance bénéfice/risque, la réponse clinique à un traitement précédent et la présence des manifestations extra-intestinales ou de complications. Par exemple, pour les patients n'ayant pas une maladie très active, une des «options thérapeutiques» est de ne pas donner de traitement [Dignass et al. 2010].

L'objectif des traitements dans les MICI est, dans un premier temps, d'induire la rémission puis, dans un second temps, de la maintenir pour éviter les rechutes et les recours à la chirurgie [Dignass et al. 2010, Kaistha and Levine 2014].

En pratique, deux stratégies s'opposent et l'adhésion du patient est indispensable pour choisir l'option la plus adaptée:

i) La stratégie ascendante ou «set-up» classique débutant par des molécules de première ligne peu toxiques, et ensuite des médicaments plus puissants seront introduits en cas d'échec. Pour la maladie de Crohn, cette stratégie commence en général par des salicylés à fortes doses, suivis par des corticoïdes, puis l'azathioprine (AZA), le méthotrexate (MTX) et enfin les anti-TNF.

ii) La stratégie «top-down» qui consiste à débuter avec des traitements puissants (immunosuppresseurs ou anti-TNF) afin de réduire rapidement l'inflammation et les symptômes, puis de maintenir une rémission avec des traitements moins agressifs.

Il existe trois catégories de médicaments utilisés dans les MICI: les anti-inflammatoires coliques, les corticoïdes systémiques et les immunosuppresseurs [Bouma and Strober 2003].

Les anti-inflammatoires coliques incluent les aminosalicylés et les corticoïdes locaux par voie rectale. Sur la base de méta-analyses, les aminosalicylés ne sont pas recommandés dans la maladie de Crohn, par contre, ils sont recommandés dans la RCH pour l'induction de la rémission et la prévention de rechutes [Dignass et al. 2010, Feagan and Macdonald 2012]. Les corticoïdes locaux par voie orale ont une action anti-inflammatoire localisée, limitée à la muqueuse intestinale.

Les corticoïdes systémiques (prednisone et budésonide) sont efficaces pour induire la rémission dans la maladie de Crohn mais ils sont inefficaces pour le maintien de la rémission à long terme [Steinhart et al. 2003, Sandborn et al. 2007, Seow et al. 2008]. L'efficacité des corticoïdes doit être contrebalancée par leurs effets indésirables observés chez environ 40% des patients [Rutgeerts et al. 1994].

Les immunosuppresseurs sont largement utilisés dans les MICI. Les thiopurines, le MTX, les inhibiteurs de la calcineurine (ciclosporine et tacrolimus) et les anti-TNF sont recommandés pour le traitement des MICI. Les trois premières classes de médicaments cités seront décrites plus en détail (**IV. Les médicaments immunosuppresseurs**).

Les anti-TNF sont des anticorps dirigés contre le facteur pro-inflammatoire TNF-α et sont représentés par 4 médicaments indiqués dans les MICI (infliximab, adalimumab, certolizumab pegol et golimumab) avec une efficacité clinique comparable et des effets indésirables similaires [Dignass et al. 2010]. Ils permettent de diminuer l'inflammation chronique au niveau de la muqueuse intestinale ainsi que la production de TNF-α [Murch et al. 1993]. Ces médicaments sont très efficaces pour l'induction et le maintien de la rémission dans la maladie de Crohn dès les 4 premières semaines de traitement [D'Haens et al. 2008]. Ils sont également utilisés en association (combothérapie) avec l'azathioprine dans les stratégies «top-down» [D'Haens et al. 2008].

III.3. Transplantation d'organes

La transplantation est l'implantation d'un organe (ou tissu ou cellules) sain d'un individu (donneur) à un autre individu (receveur). Chirurgicalement, la transplantation d'organes est devenue une technique réalisée couramment. Cependant, la pénurie d'organes disponibles et les réactions de rejet contre le greffon constituent des limites à cette thérapeutique [Kindt et al. 2007b].

Le premier transplant humain couronné de succès a été réalisé en 1954 par Joseph Murray à l'hôpital *Peter Bent Brigham* (Boston, États-Unis). Il a réalisé une transplantation de rein humain entre deux jumeaux monozygotes [Sayegh and Carpenter 2004, Kindt et al. 2007b, Shrestha et al. 2015]. L'organe a fonctionné immédiatement et le patient a survécu 9 ans [Sayegh and Carpenter 2004, Shrestha et al. 2015].

Par la suite, les transplantations réalisées avec succès l'ont été entre jumeaux monozygotes, la généralisation de la technique à des individus sans parenté a nécessité le développement de traitements en vue de supprimer le système immunitaire du receveur. Les premiers essais avec l'irradiation du corps entier pour détruire les cellules sanguines dans la moelle osseuse ont été réalisés mais l'importance des effets secondaires a rapidement fait abandonner cette stratégie [Shrestha et al. 2015].

En 1959, Robert Schwartz et William Dameshek ont testé la 6-mercaptopurine (6-MP), indiquée dans le traitement de la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL), comme immunosuppresseur après transplantation de la peau chez le lapin. Compte tenu des résultats positifs, le laboratoire «Wellcome Research Laboratory» a synthétisé plusieurs analogues de la 6-MP, dont l'azathioprine, pour évaluer leurs propriétés immunosuppressives chez des chiens transplantés. L'azathioprine a été sélectionnée car elle favorisait la survie à long terme. Finalement, en 1962 les premiers essais cliniques chez les patients ont démarré. Grâce à ces résultats, Joseph Murray a obtenu le prix Nobel pour avoir réalisé la première transplantation rénale chez l'Homme en y associant des immunosuppresseurs. George Hitchings et Gertrude Belle Elion ont reçu un prix Nobel en 1988 pour leurs travaux ayant permis le développement de la 6-MP, l'azathioprine et une série d'analogues de purines [Sayegh and Carpenter 2004, Shrestha et al. 2015].

A la suite de l'azathioprine, d'autres immunosuppresseurs ont été découverts et utilisés pour éviter le rejet après la transplantation d'organes. L'azathioprine a été remplacée au cours du temps car les nouveaux immunosuppresseurs étaient plus efficaces avec moins d'effets secondaires. Actuellement, la transplantation de reins, pancréas, cœur, poumon, foie, moelle osseuse et cornée entre individus non-identiques a été rendue possible grâce aux études d'histocompatibilité entre le donneur et le récepteur et aux médicaments immunosuppresseurs [Kindt et al. 2007b].

III.3.1.Transplantation dans l'Union Européenne et dans le monde

Des données épidémiologiques attestent de l'essor mondial de la transplantation tous organes confondus. Ainsi, le 31 décembre 2013, 63 000 patients pour 508 millions d'habitants étaient inscrits sur la liste d'attente pour une greffe d'organe dans l'Union Européenne. Approximativement, 50 000 patients étaient dans l'attente d'un rein, 6 700 d'un foie, 3 450 d'un cœur, 2 100 d'un poumon, 1 300 d'un pancréas et 70 d'un intestin grêle. De plus, il a été estimé que 4 100 patients sont décédés alors qu'ils figuraient sur la liste d'attente en 2013 faute de greffon disponible [Commission 2014]. Entre 2004 et 2013, il y a eu une augmentation globale de 33% pour les dons d'organes, avec +18% de donneurs morts et +86% de donneurs vivants. Plus spécifiquement, on dénombre en France a 26 donneurs morts par million d'habitants et 6,2 donneurs vivants par million d'habitants [Commission 2014]. L'Union Européenne réalise le quart des greffes mondiales [Commission 2014].

La France, le Portugal, l'Espagne, la Suisse et l'Italie font partie de la «South Alliance for Transplants» pour coopérer dans la gestion de la transplantation d'organes. Le rein est l'organe le plus transplanté dans ces 5 pays, suivi du foie, cœur, poumon et pancréas. Au total, en 2014, l'Espagne avait réalisé 90 transplantations par million d'habitants suivi de la France avec 79,6 [Commission 2014, EDQM 2015] (**Tableau 6**).

Organe	Transplantations par million d'habitants en 2014	Organe	Transplantations par million d'habitants en 2014
Rein	France : 50 Portugal : 42,3 Espagne : 56,9 Suisse : 36,7 Italie : 30,1	**Poumon**	France : 5,3 Portugal : 1,5 Espagne : 5,6 Suisse : 6,8 Italie : 2,1
Foie	France : 19,8 Portugal : 19,1 Espagne : 22,7 Suisse : 13,5 Italie : 17,6	**Pancréas**	France : 1,2 Portugal : 2,5 Espagne : 1,7 Suisse : 1,3 Italie : 0,7
Cœur	France : 6,7 Portugal : 4,1 Espagne : 5,6 Suisse : 4,4 Italie : 3,7	**Totale**	France : 79,6 Portugal : 69,7 Espagne : 90,2 Suisse : 61,5 Italie : 53,2

Tableau 6. Organes transplantés par million d'habitants en 2014 dans les pays de l'Europe appartenant à la «South Alliance for Transplants».
De: [Commission 2014, EDQM 2015].

En plus des organes cités ci-dessus, la cornée (de cadavre, sans immunosuppression nécessaire), la peau (autologue, par brûlures), la moelle osseuse (donneur vivant avec histocompatibilité ABO et HLA nécessaire) et le sang (donneur vivant avec histocompatibilité ABO et Rh) peuvent être greffés [Kindt et al. 2007b].

L'organe le plus transplanté au monde est le rein. En Europe, en 2013, 24 082 transplantations de reins ont été réalisées, 30% des greffons provenant de donneurs vivants. Le Pays-Bas est le pays de l'Europe réalisant le plus de greffes rénales par million d'habitants (56,8) avec la moitié de donneurs vivants, suivi de l'Espagne (54,4), la Norvège (53,8) et l'Angleterre (51,6). La France est en 7ème position (47,8). Aux Etats-Unis, en 2013, 17 657 transplantations de reins ont été réalisées, c'est-à-dire, approximativement 55 par million d'habitants [Commission 2014].

III.3.2. Transplantation rénale

La transplantation du rein est la meilleure option thérapeutique chez les patients en cas d'insuffisance rénale chronique sévère (grade 5) car elle favorise la qualité de vie et la survie [Legendre et al. 2007, Pallet and Thervet 2012, Shrestha et al. 2015]. Le diabète et certains types de néphropathies entraînent l'apparition d'une insuffisance rénale pouvant aboutir à la

transplantation [Kindt et al. 2007b]. Enfin, les reins étant des organes très accessibles, les procédures chirurgicales ne sont pas très complexes.

Par contre, la pénurie d'organes disponibles reste le problème majeur, bien que ce problème régresse grâce aux donneurs vivants. Par exemple, aux États-Unis, 615 000 patients ont une insuffisance rénale chronique mais moins de 30% ont reçu une greffe rénale [Kindt et al. 2007b, Khan et al. 2016].

Une fois que la transplantation rénale a été réalisée, le principal danger est d'avoir des réactions de rejet à la greffe. Durant la dernière décennie, les améliorations thérapeutiques ont permis d'atteindre des taux de survie à un an et à dix ans après la transplantation respectivement de 92% et 80%. Malgré ces données encourageantes, un pourcentage non négligeable de patients développe des réactions de rejet qui ne sont pas prévisibles [Pallet and Thervet 2012].

- Réactions de rejet à la greffe

Le greffon peut être rejeté à la suite d'une réaction hyper-aiguë (moins de 24 heures), aiguë (à partir de 10 jours après la transplantation) ou chronique (des années plus tard).

Les réactions hyper-aiguës se déclenchent entre quelques minutes et quelques heures après la reperfusion de l'organe greffé et sont la conséquence d'une quantité importante d'anticorps anti-donneur qui réagissent avec l'endothélium vasculaire du receveur [Khan et al. 2016]. Le complexe anticorps-antigène active le complément et induit l'infiltration des neutrophiles dans le tissu greffé. Le déclenchement de la réaction inflammatoire va produire la formation de caillots qui va empêcher la revascularisation du greffon, et donc sa perte de fonction. La réponse est très rapide car les anticorps sériques dirigés contre les antigènes du donneur sont déjà présents chez le receveur. C'est le cas notamment pour les patients qui ont reçu des transfusions sanguines répétées, qui ont plus de risque d'avoir déjà été en contact avec les mêmes antigènes que ceux du donneur. De même, des grossesses multiples favorisent le contact avec les allo-antigènes paternels et le développement des anticorps. Enfin, un antécédent de greffe augmente le risque de rejet hyper-aigu [Kindt et al. 2007b, Shrestha et al. 2015]. Les analyses d'histocompatibilité entre donneur et receveur ainsi que la connaissance de l'histoire clinique du patient sont donc nécessaires pour minimiser ce risque.

Le rejet aigu, qui peut être cellulaire ou humoral, se manifeste dans un délai variant entre quelques jours et quelques mois après la transplantation [Kindt et al. 2007b, Legendre et al. 2014]. Histologiquement, la greffe présente un infiltrat massif de macrophages et de lymphocytes dans le tissu interstitiel et les tubules associé à des modifications des artères [Khan et al. 2016]. Actuellement, grâce aux traitements immunosuppresseurs et à la prise en considération des facteurs de risque (âge, retard de fonction du greffon, ethnie, caractéristiques immunologiques) le risque de rejet aigu a diminué de moitié en 20 ans et s'est stabilisé autour de 10 à 25% des transplantés un an après la greffe [Lebranchu et al. 2013, Pratschke et al. 2016]. Le rejet aigu

humoral est moins bien connu, du fait d'une description plus récente dans les années 90. En plus d'être caractérisé par la présence de lésions histologiques et d'un dysfonctionnement de l'activité rénale, il peut être défini grâce à la présence d'anticorps anti-donneur, le plus couramment anti-HLA. Dans ce cas, les traitements ont pour objectif d'éliminer les anticorps existants, d'empêcher la formation de nouveaux anticorps et d'inhiber la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes [Legendre et al. 2014].

Finalement, le rejet chronique peut apparaître plusieurs années après la greffe par des mécanismes humoraux et cellulaires. Il est la conséquence d'une fibrose chronique du greffon s'accompagnant d'une perte de fonction. Malgré les avancées dans la compréhension des mécanismes immunologiques et non-immunologiques du rejet chronique, il reste difficile à éviter à long terme pouvant aboutir à une nouvelle transplantation [Kindt et al. 2007b, Khan et al. 2016].

La découverte de traitements immunosuppresseurs plus efficaces et l'amélioration des typages tissulaires pour obtenir une meilleure histocompatibilité donneur-receveur ont permis d'augmenter considérablement la survie des organes au cours des premières années suivant la greffe [Kindt et al. 2007b]. Cependant, des progrès restent à accomplir pour réduire encore le rejet chronique et comprendre pourquoi certains patients développent une tolérance.

- Immunotolérance

L'immunotolérance, décrite comme l'acceptation indéfinie du tissu greffé avec maintien de la fonction rénale, est classée en «induite» par les médicaments ou en «spontanée» (ou opérationnelle), ce qui correspond à un évènement rare survenant chez 0,03% des patients transplantés [Waldmann and Cobbold 2004, Walsh et al. 2004, Carreras-Planella et al. 2016, Lu and Zhang 2016]. L'analyse du système immunitaire des patients développant une tolérance opérationnelle est essentielle en vue de mieux comprendre les mécanismes de tolérance et d'établir des protocoles de traitement pour l'induire chez les autres transplantés et ainsi éviter les réactions de rejet [Lu and Zhang 2016].

Un des objectifs actuels dans le domaine de la transplantation rénale est d'arriver à établir une tolérance vis-à-vis de l'allogreffe en l'absence de médicaments immunosuppresseurs généralisés comportant des effets indésirables potentiellement sévères [Lu and Zhang 2016].

Bien que des résultats prometteurs aient été obtenus chez les rongeurs, les études cliniques chez l'Homme sont sur le plan éthique complexes à réaliser sachant que les traitement actuels sont efficaces à court et moyen terme et que la plupart des protocoles expérimentés chez l'animal impliquent l'irradiation lymphoïde totale ou la transplantation de la moelle osseuse du donneur, par exemple [Waldmann and Cobbold 2004, Kawai and Cosimi 2010]. Parmi toutes ces options, la transplantation de la moelle osseuse d'un donneur est la seule procédure qui a eu du succès chez certains patients. Dans ce cas, le receveur maintient ces cellules myéloïdes et reçoit la moelle

osseuse du donneur, avec comme résultat une hématopoïèse chimérique issue d'un mélange du donneur et du receveur [Kawai and Cosimi 2010].

Les cellules du système immunitaire ayant un rôle important dans l'immunotolérance ont été caractérisées. Il s'agit de certains sous-types de lymphocytes B et T, de cellules NK, des cellules dendritiques, des macrophages mais aussi des cellules myéloïdes suppressives (MDSC, de l'anglais, myeloid-derived suppressor cells) (pour plus de détails [Lu and Zhang 2016]).

Les MDSC correspondent à une population de cellules possédant une activité immunosuppressive importante par inhibition de la prolifération des lymphocytes T et en favorisant l'expansion des Tregs [Khan et al. 2016].

Les Tregs $CD4^+$ $FOXP3^+$ sont les cellules le plus étudiées dans l'induction de la tolérance. L'expansion des Tregs modifie l'équilibre entre le rejet et la tolérance à long terme et constitue une nouvelle voie de recherches pour développer des thérapies cellulaires. Certaines études ont montré que la tolérance après la greffe dépend de l'infiltration locale des Tregs, car l'enrichissement en Tregs au niveau de l'organe greffé entraîne la suppression de l'activité des cellules T effectrices [Waldmann and Cobbold 2004, Naesens and Sarwal 2010a, Hu et al. 2016].

Plus récemment, le rôle équivoque des lymphocytes B a été démontré, car non seulement ils produisent des anticorps capables d'induire un rejet aigu puis chronique mais à l'inverse certains sous-types possèdent des fonctions immuno-régulatrices. Les cellules B régulatrices (Bregs) constituent un nouveau sous-type lymphocytaire qui contrôle les réactions immunitaires par la sécrétion d'IL-10. Bien que des études rapportent le rôle des Bregs dans la tolérance à la greffe, les mécanismes exacts, la signature phénotypique de cette population lymphocytaire et ses propriétés immuno-régulatrices ne sont pas encore totalement élucidés [Carreras-Planella et al. 2016].

Au final, l'induction de la tolérance comme traitement reste encore une piste de recherches restant à valider cliniquement. Pour la tolérance opérationnelle, une signature moléculaire chez ces patients permettra de mieux comprendre les mécanismes différentiels mis en jeu. Toutefois, actuellement le traitement de choix consiste à inhiber la réponse allo-immunitaire par des médicaments immunosuppresseurs ayant démontré une bonne efficacité à court et moyen terme.

- La réponse allo-immunitaire

La réponse immunitaire contre l'allo-greffe régulée par les cellules T est la cible de la plupart des médicaments immunosuppresseurs développés pour éviter les réactions de rejet du greffon. Dans le greffon et les tissus environnants, les CD du donneur et du receveur sont activées et migrent vers les tissus lymphoïdes secondaires, où elles vont activer à leur tour les cellules T naïves et mémoire [Halloran 2004, Khan et al. 2016]. De même, les lymphocytes B vont se différencier en plasmocytes et produire des anticorps anti-HLA qui vont interagir avec ceux du donneur, avec pour

conséquence l'activation du complément et le déclenchement de la réponse immunitaire [Khan et al. 2016].

Étant donné le rôle central de l'activation et de la prolifération des lymphocytes T dans le mécanisme de rejet du greffon, de nombreux médicaments immunosuppresseurs commercialisés bloquent, par différentes voies, cette activation lymphocytaire.

- Prise en charge thérapeutique

La découverte des médicaments immunosuppresseurs a permis de prolonger la survie des organes greffés par un effet immunosuppresseur systémique mais avec des effets secondaires graves à long terme, comme un risque augmenté de cancer et d'infections [Sayegh and Carpenter 2004, Feldmann and Steinman 2005]. C'est pour cela que pour maximiser les effets thérapeutiques et minimiser les toxicités à court et à long terme, plusieurs essais cliniques ont été réalisés pour optimiser les protocoles thérapeutiques et les combinaisons de molécules.

L'arsenal thérapeutique actuellement disponible, comporte des molécules principalement utilisées au moment de la transplantation et dans les jours qui suivent celle-ci. Utilisées comme traitement d'induction, elles provoquent un état de non-réponse immunitaire envers le greffon en déplétant ou bloquant la prolifération cellulaire des lymphocytes T, élément clé de la réponse allo-immune. D'autres molécules dont l'objectif est la prévention du rejet aigu par le blocage des signaux cellulaires entre les lymphocytes et les cellules présentatrices d'antigène seront utilisées au long cours comme traitement d'entretien ou de maintenance.

Les traitements d'induction notamment en France sont utilisés, soit de principe, soit en cas de reprise retardée de fonction du greffon, soit en cas de risque immunologique. Les sérums polyclonaux sont plutôt employés en cas de risque immunologique élevé, les anticorps monoclonaux en cas de risque immunologique faible:

i) les immunoglobulines antilymphocytaires: les anticorps polyclonaux (ATG-Fresenius® et Thymoglobuline®) sont produits par l'immunisation d'animaux contre des antigènes lymphocytaires humains. Ils sont utilisés comme agents d'induction durant trois à dix jours pour produire une profonde lymphopénie, pouvant durer plus d'un an. Les principaux effets secondaires sont une lymphopénie, une thrombocytopénie transitoire, un syndrome de libération des cytokines et occasionnellement une maladie sérique, associant fièvre et arthralgies [Balssa et al. 2011];

ii) les anticorps anti-récepteurs de l'IL-2 (anticorps anti-CD-25): le basiliximab (Simulect®), anticorps monoclonal chimérique, et le daclizumab (Zenapax®), anticorps monoclonal humanisé, tous deux dirigés contre le récepteur d'IL-2, sont utilisés en traitement d'induction. Ils entraînent une réduction de 30 à 40 % du risque relatif de rejet aigu à six mois quelle que soit la combinaison d'immunosuppresseurs. En revanche, ils permettent

de diminuer les doses nécessaires des autres immunosuppresseurs et donc de limiter les effets secondaires [Halloran 2004, Balssa et al. 2011, Khan et al. 2016, Lim et al. 2017].

Au cours de la phase de maintenance, l'azathioprine (ou la 6-MP), le MPA, la rapamycine, le tacrolimus, la ciclosporine, les corticoïdes (prednisone) et la protéine de fusion Belatacept (qui bloque le signal de co-stimulation CD80/86) sont utilisés selon différentes combinaisons pour cibler plusieurs voies de signalisation et empêcher l'activation et la prolifération des lymphocytes T [Halloran 2004, Kindt et al. 2007b, Khan et al. 2016, Lim et al. 2017] (**Figure 13**). Durant cette phase de maintenance, il y a une réduction progressive de la dose des immunosuppresseurs au cours du temps, permettant une suppression de la réponse immunitaire efficace grâce à l'utilisation de plusieurs immunosuppresseurs, une prévention du rejet aigu et une limitation de la dose des médicaments utilisées pour minimiser les toxicités en particulier vis-à-vis du greffon [Halloran 2004, Kindt et al. 2007b, Khan et al. 2016]. L'objectif principal de la phase de maintenance est de parvenir à l'équilibre entre la prévention du rejet et la préservation de la fonction rénale du greffon [Lim et al. 2017].

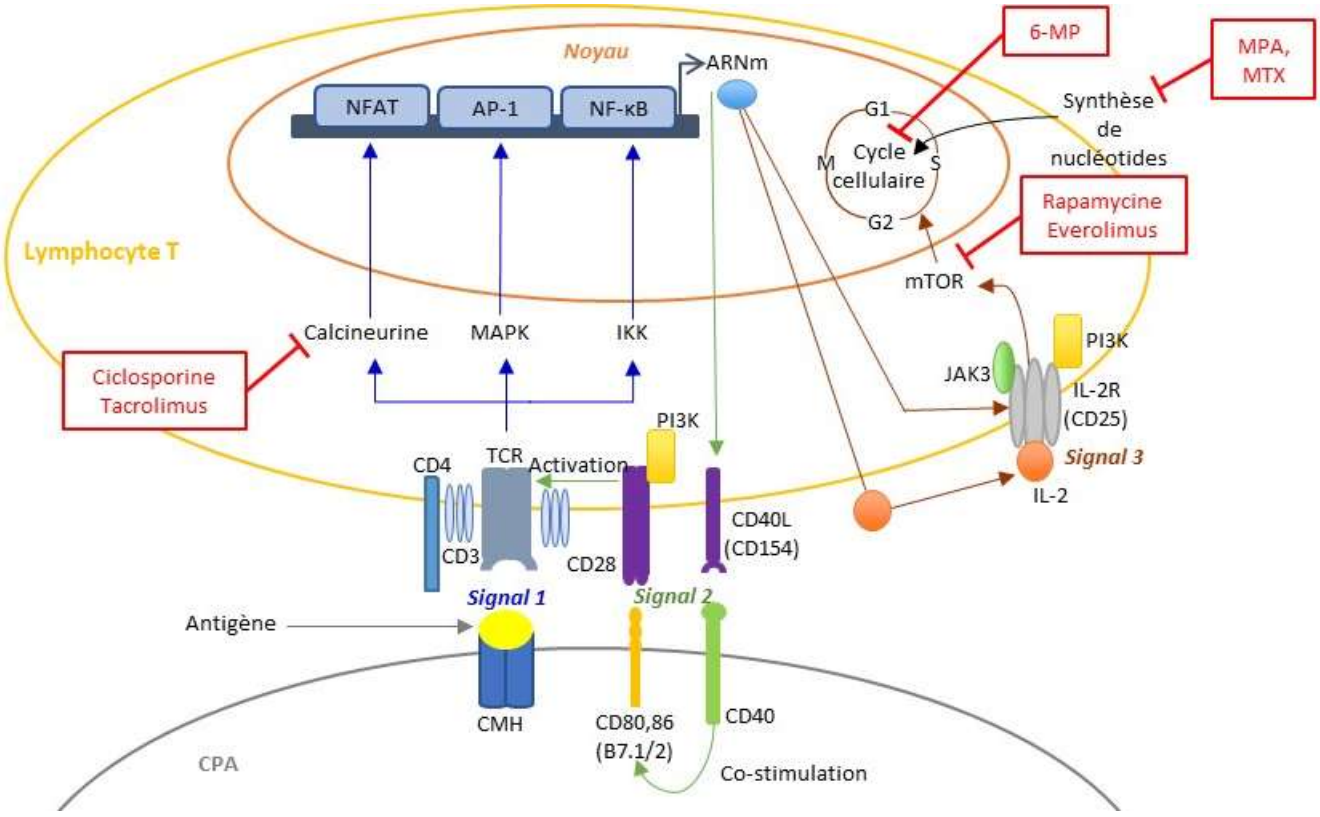


Figure 13. Cibles pharmacologiques des médicaments immunosuppresseurs dans la cascade d'activation des lymphocytes T.

6-MP: 6-mercaptopurine; AP-1: protéine activatrice 1; ARNm: acide ribonucléique messager; CD28: cluster de différenciation 28; CD3: cluster de différenciation 3; CD4: cluster de différenciation 4; CD40: cluster de différenciation 40; CD40L: ligand de CD40 ou CD154; CD80/86: cluster de différenciation 80/86; CMH: complexe majeur d'histocompatibilité; CPA: cellule présentatrice d'antigène; IKK: kinase IKB; IL-2: interleukine 2; IL-2R : récepteur d'IL-2; JAK3: janus kinase 3; M: mitose; MAPK: mitogen-activated protein kinases; MPA: acide

mycophénolique; mTOR: cible de la rapamycine chez les mammifères; MTX: méthotrexate; NFAT: facteur nucléaire des lymphocytes T actives; NF-κB: nuclear factor-kappa B; PI3K: phosphoinositide 3-kinase; TCR: récepteur des cellules T. Adaptée de: [Fernández-Ramos et al. 2016]

Bien que tous ces immunosuppresseurs soient utilisés dans la phase de maintenance, ils ne sont pas prescrits de façon identique. La **figure 14** montre l'évolution de la prescription des immunosuppresseurs utilisés entre 2003 et 2013 aux États-Unis. Parmi les inhibiteurs de la calcineurine, le tacrolimus est de plus en plus prescrit tandis que l'utilisation de la ciclosporine diminue. Parmi les médicaments anti-métabolites, le MPA est très administré alors que l'azathioprine est très peu prescrite même si elle fut le premier immunosuppresseur utilisé en transplantation rénale du fait d'un profil bénéfice/risque moins favorable. On constate également que les inhibiteurs de mTOR sont peu utilisés dans la phase initiale de l'immunosuppression [Lim et al. 2017].

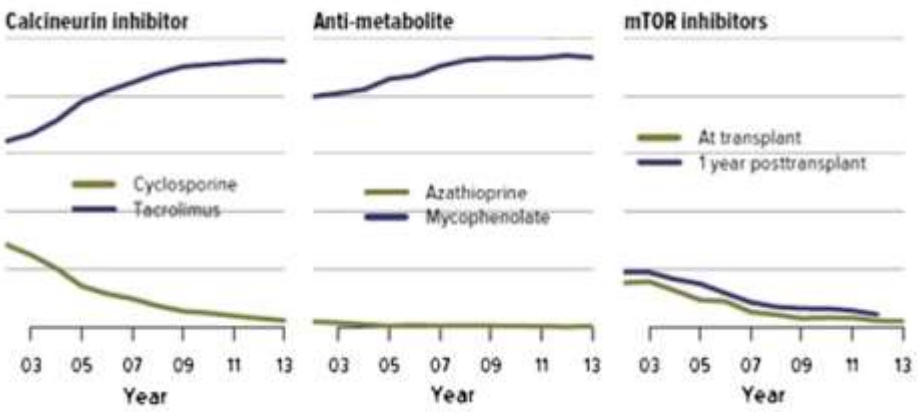


Figure 14. Évolution de la prescription des médicaments immunosuppresseurs utilisés dans la phase de maintenance après transplantation rénale chez l'adulte.
Données recueillies entre 2003 et 2013 aux États-Unis. De: [Lim et al. 2017].

La survie après transplantation d'organe a considérablement augmenté pendant les 60 dernières années, grâce à une meilleure compréhension de la réponse immunitaire et au développement des médicaments immunosuppresseurs plus performants. Il reste encore à comprendre pourquoi un nombre limité de patients deviennent «tolérants» au greffon hors traitement immunosuppresseur, ou encore à identifier les facteurs prédictifs de la réponse ou de l'échappement thérapeutique aux immunosuppresseurs afin d'optimiser les protocoles d'immunosuppression et les combinaisons des différentes molécules.

IV. Les médicaments immunosuppresseurs

IV.1. La 6-mercaptopurine

La 6-mercaptopurine (6-MP), avec la 6-thioguanine (6-TG) et l'azathioprine font partie de la classe des thiopurines, médicaments classés comme antiprolifératifs possédant des propriétés anti-inflammatoires, immunosuppressives et anticancéreuses [Karran and Attard 2008].

IV.1.1. Découverte des thiopurines

En 1951, GB Elion et G Hitchings synthétisent la 6-MP (Purinéthol®) et la 6-TG (Lanvis®), molécules qui inhibent la synthèse des purines, utilisées initialement pour le traitement des leucémies. Plus spécifiquement, la 6-MP a été approuvée en 1953 par la FDA (Food and Drug Administration) pour le traitement de la LAL chez l'enfant car le traitement par la 6-MP prolongeait l'espérance de vie de 3 à 12 mois. Néanmoins, les effets secondaires étaient très importants et les mécanismes de toxicité n'étaient pas identifiés [Elion 1989].

G.B. Elion et G. Hitchings ont poursuivi la synthèse de médicaments anti-métabolites. Dans les années 60, ils ont développé l'azathioprine (Imurel®), une pro-drogue de la 6-MP avec des caractéristiques pharmacocinétiques plus favorables, ayant des propriétés immunosuppressives et indiquée pour la première fois dans la prévention d'un rejet au cours de la transplantation d'organes et dans certaines maladies auto-immunes. Enfin, il faut noter que G.B. Elion a également synthétisé l'acyclovir, le premier médicament antiviral contre les virus Herpès [Elion 1989].

G.B. Elion et G. Hitchings ont reçu le Prix Nobel de Médecine en 1988 grâce au développement de l'ensemble de ces médicaments innovants qui ont radicalement changé la prise en charge thérapeutique des patients aussi bien dans les LAL qu'en transplantation [Nobelprize.org 2014].

IV.1.2. Structures chimiques

Les thiopurines, comprenant la 6-MP, la 6-TG et l'azathioprine, ont une structure chimique dérivée de la purine, à l'origine des bases puriques (guanine et adénine) qui sont les constituants des nucléotides des acides nucléiques (ADN et ARN) (**Figure 15**).

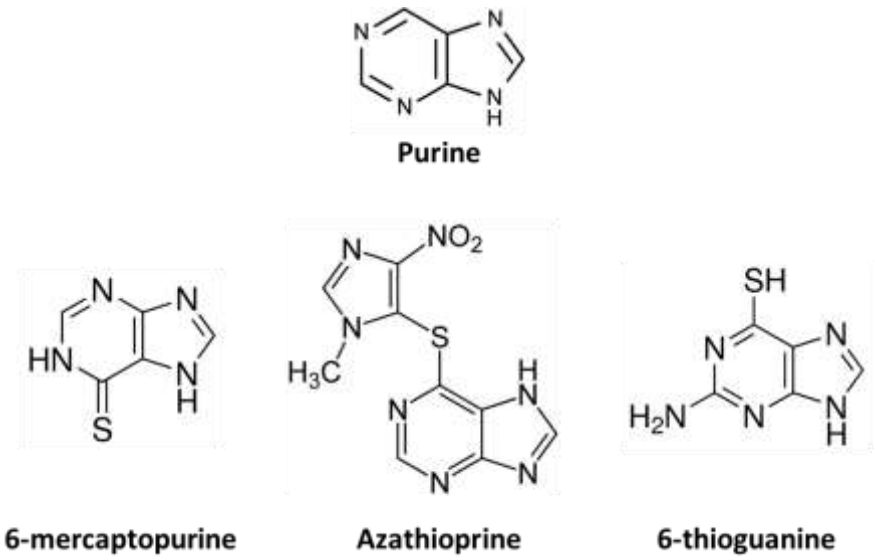


Figure 15. Structures chimiques de la purine et des thiopurines.
Purine, 6-mercaptopurine, azathioprine et 6-thioguanine [Chouchana 2014].

Les thiopurines sont des analogues de purines qui possèdent un groupement thiol, c'est-à-dire, un groupement sulfhydryle (-SH) fixé sur un carbone. Dans l'organisme, elles sont métabolisées en thioguanines puis en nucléotides à thioguanine [Chouchana 2014].

L'azathioprine est le précurseur inactif (prodrug en anglais) de la 6-MP sur laquelle un groupement méthylnitro-imidazole a été greffé au niveau de la fonction thiol, pour la protéger d'une oxydation ou d'une hydrolyse [Elion 1989, Chouchana 2014].

IV.1.3. Propriétés pharmacologiques

- Pharmacocinétique

Après administration, la 6-MP et l'azathioprine sont rapidement absorbées, puis l'azathioprine est hydrolysée en 6-MP par des glutathions S-transférases (GST) en présence du glutathion [Kurowski and Iven 1991, Eklund et al. 2006, Eklund and Mannervik 2007, Kurtovic et al. 2008]. La biodisponibilité de la 6-MP est d'environ 16% avec d'importantes variations interindividuelles allant de 5 à 37% [ANSM 2013].

La 6-MP subit un effet de premier passage très précoce avec une métabolisation en acide thiourique au sein de la paroi du tube digestif sous l'effet de la xanthine oxydase (XO) [Bronk et al. 1988, Kurowski and Iven 1991]. Jusqu'à un quart de la dose administrée peut être retrouvé sous forme d'acide thiourique dans les urines [Ansari et al. 2008].

Ensuite, la distribution est très rapide, la demi-vie de la 6-MP est estimée à environ 1-2 heures, avec une variation de réponse inter- et intra-individuelle [Zimm et al. 1983]. La 6-MP se distribue dans le foie, la rate et la moelle osseuse [Hyslop and Jardine 1981].

Après la captation intracellulaire *via* différents transporteurs de nucléosides, la 6-MP peut être métabolisée selon trois voies enzymatiques différentes incluant les voies cataboliques de la XO et de la thiopurine S-méthyltransférase (TPMT) et la voie anabolique de l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HPRT) (**Figure 16**) [Hartman and Buchanan 1959, Elion 1967, Bronk et al. 1988, Zaza et al. 2005, Fotoohi et al. 2006, Peng et al. 2008, Chouchana et al. 2012]:

i) La XO, oxydant la 6-MP en acide thiourique, métabolite inactif hydrosoluble qui sera éliminé dans les urines, est quantitativement la voie catabolique la plus importante [Cara et al. 2004, Chouchana et al. 2012, Fong et al. 2015]. Par ailleurs, les cellules sanguines, ne possédant pas d'activité XO, ont probablement par conséquence une grande sensibilité à la 6-MP [Marchesi and Sartorelli 1963].

ii) La TPMT, catalyse l'étape de méthylation de la 6-MP en 6-méthylmercaptopurine (6-MMP), la S-adénosylméthionine (SAM) étant le donneur de méthyl, qui pourra être ensuite transformée en 6-méthylmercapto-8-hydroxypurine (6-Me-8OH-MP) par l'aldéhyde oxydase (AOX) [Cara et al. 2004, Chouchana et al. 2012, Fong et al. 2015]. L'activité de la TPMT très variable dans la population générale est sous la dépendance de polymorphismes génétiques [Taylor et al. 2005].

iii) L'HPRT catalyse la formation du 6-thioinosine monophosphate (6-TIMP) nucléotide qui aura un rôle central dans ce métabolisme et aboutira à la formation des métabolites actifs. C'est la voie d'activation qui aboutit à la formation des 6-thioguanine nucléotides (6-TGN) [Cara et al. 2004, Chouchana et al. 2012, Fong et al. 2015].

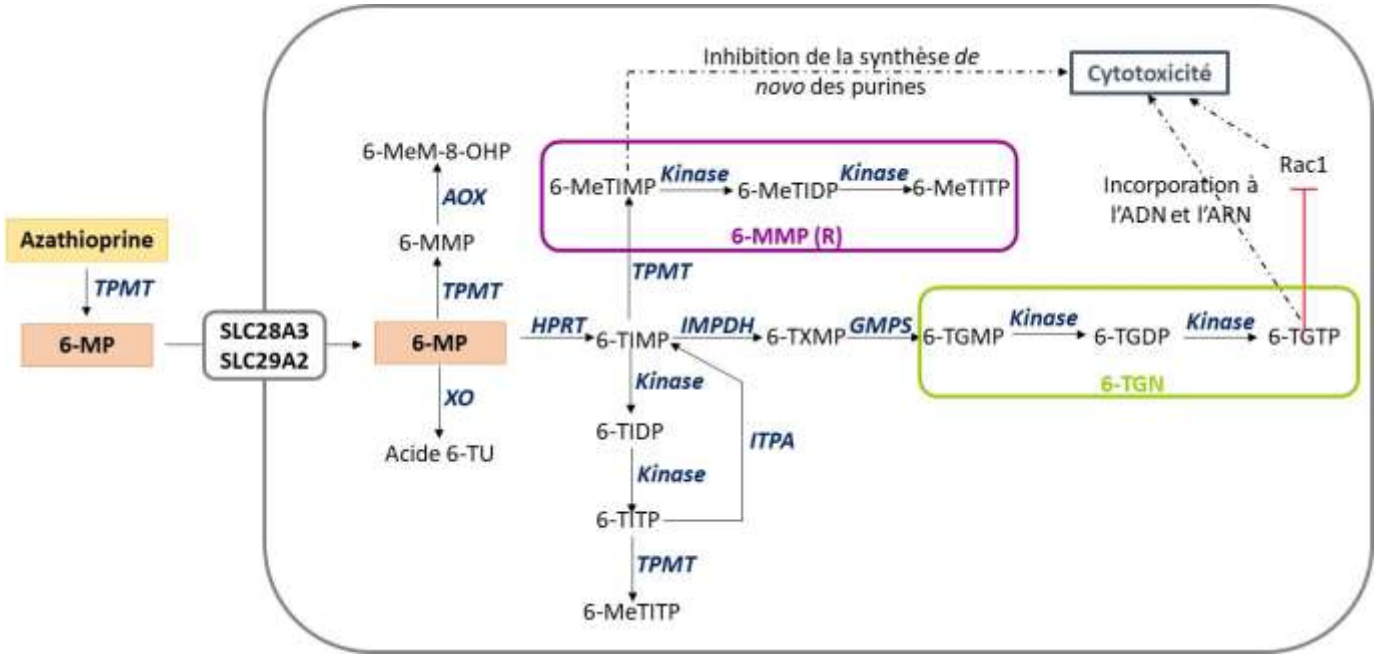


Figure 16. Métabolisme des thiopurines.
L'azathioprine est métabolisée par la TPMT pour former la 6-MP, qui pénètre dans les cellules grâce aux transporteurs SLC28A3 ou SLC29A2. Ensuite, la 6-MP peut suivre trois voies différentes: 1) oxydation par la XO donnant l'acide 6-TU; 2) méthylation par la TPMT puis l'AOX

aboutissant au 6-MeM-8-OHP; ou 3) la métabolisation par l'HPRT qui produit le 6-TIMP. Ensuite, le 6-TIMP peut être métabolisé par 3 voies différentes: i) par des kinases successives puis à nouveau la TPMT pour former le 6-MeTITP; ii) par la TPMT puis des kinases pour former les 6-MMP (R); ou iii) par l'IMPDH, suivie de GMPS et des kinases pour former les 6-TGN. Le 6-MeTIMP et le 6-TGTP sont responsables de la cytotoxicité et de la mort cellulaire. 6-MeM-8-OHP: 6-méthylmercapto-8-hydroxypurine; 6-MeTIDP: 6-méthylthioinosine diphosphate; 6-MeTIMP: 6-méthylthioinosine monophosphate; 6-MeTITP: 6-méthylthioinosine triphosphate; 6-MMP (R): 6-méthylmercaptopurine ribonucléotide; 6-MMP: 6-méthylmercaptopurine; 6-MP: 6-mercaptopurine; 6-TGDP: 6-thioguanine diphosphate; 6-TGMP: 6-thioguanine monophosphate; 6-TGN: 6-thioguanine nucleotides; 6-TGTP: 6-thioguanine triphosphate; 6-TIDP: 6-thioinosine diphosphate; 6-TIMP: 6-thioinosine monophosphate; 6-TITP: 6-thioinosine triphosphate; 6-TXMP: 6-thioxanthosine monophosphate; Acide 6-TU: acide 6-thiourique; AOX: aldéhyde oxydase; GMPS: guanosine monophosphate synthetase; GST: glutathione S-transférase; HPRT: hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase; IMPDH: inosine monophosphate dehydrogenase; ITPA: inosine triphosphatase; SLC28A3: solute carrier family 28 member 3; SLC29A2: solute carrier family 29 member 2; TPMT: thiopurine S-méthyltransférase; XO: xanthine oxydase. Modifiée de: [Chouchana et al. 2012, Fong et al. 2015, Moon and Loftus 2016].

L'activation *via* l'HPRT aboutit à la formation de 6-TIMP, qui peut suivre 3 voies différentes. Dans les cellules nucléées uniquement (à l'exclusion des érythrocytes car ils sont anucléés), TIMP est métabolisé pour produire les 6-TGNs qui regroupent le 6-thioguanine monophosphate (TGMP), diphosphate (TGDP) et triphosphate (TGTP). Les 6-TGN sont les métabolites actifs qui vont exercer les effets cytotoxiques et immunosuppresseurs suite à leur incorporation dans l'ARN et l'ADN, mais aussi par inhibition de Rac1 [Allison 2000, Taylor et al. 2005, Chouchana et al. 2012, Fong et al. 2015].

Le composé 6-TIMP est le point de départ d'un cycle futile *via* l'action de kinases successives puis de l'inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPA), enzyme qui protège en situation physiologique d'une accumulation de nucléotides puriques triphosphates, potentiellement mutagènes et clastogènes [Lin et al. 2001]. Enfin, le 6-TIMP peut être métabolisé par la TPMT pour donner des dérivés méthylés, les 6-MMP(R) qui peuvent inhiber la synthèse *de novo* des purines et provoquer la cytotoxicité [Chouchana et al. 2012].

Le métabolisme représente la voie principale d'élimination, avec moins de 10% de la dose excrétée sous forme inchangée dans les urines. La XO est la principale enzyme du catabolisme de la 6-MP. La moitié de la dose administrée est ainsi éliminée dans les urines sous forme, principalement, de métabolites [Elion 1972, ANSM 2013].

- Pharmacodynamie

L'inhibition de la prolifération cellulaire des lymphocytes T et B par la 6-MP résulte de plusieurs mécanismes [Allison 2000, Khan and Sewell 2006]. Dans les lymphocytes, la 6-MP a des effets antiprolifératifs et immunosuppresseurs selon trois mécanismes différents (**Figure 17**):

i) Les 6-MMP(R) inhibent la synthèse *de novo* de purines, et par voie de conséquence la production d'ATP et de GTP [Cara et al. 2004].

En effet, le métabolite intermédiaire 6-MeTIMP, qui fait partie des 6-MMP(R) a des effets anti-métabolites par inhibition de la synthèse *de novo* de purines [Cara et al. 2004, Chouchana et al. 2012]. Cette voie est cruciale pour la synthèse des purines car la voie de sauvetage est inactive dans les lymphocytes. Ce mécanisme ne contribue probablement que partiellement aux propriétés antiprolifératives des thiopurines [Dervieux et al. 2001, Coulthard et al. 2002, Cara et al. 2004, Taylor et al. 2005].

ii) Les 6-TGN peuvent s'incorporer dans l'ADN (et l'ARN), ce qui entraîne l'activation du système de réparation des mésappariements (mismatch repair en anglais) et induit l'apoptose [Cara et al. 2004].

Les 6-TGN agissent comme des «antagonistes» des purines pour inhiber la synthèse d'ARN, ADN et protéines [Allison 2000]. Les 6-TGN sont incorporés dans l'ADN (et l'ARN) à la place des nucléotides à guanine, en induisant la cassure du brin et, en conséquence, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Cela aboutit à une inhibition de la synthèse de nucléotides et de protéines, expliquant ainsi le blocage de la prolifération cellulaire [Chouchana et al. 2012, Fong et al. 2015].

iii) Les 6-TGN peuvent inhiber Rac1, et provoquer la mort apoptotique des lymphocytes T $CD4^+$ co-stimulés par CD28, à l'origine des effets immunosuppresseurs des thiopurines [Cara et al. 2004].

Les lymphocytes T $CD4^+$ sont activés quand il existe un signal de co-stimulation par CD28 (signal 2 d'activation), qui active des signaux intracellulaires comme la Rho guanosine triphosphatase (RhoGTPase) Rac1 qui peut elle-même activer ses gènes cibles, comme NF-κB et le transducteur de signal et activateur de la transcription 3 (STAT3) favorisant la prolifération cellulaire. Après traitement par les thiopurines, le métabolite 6-thioguanine triphosphate (6-thioGTP) se fixe sur Rac1 sur le site de liaison du GTP, induisant un blocage du signal de Rac1, avec une suppression de l'expression de ses gènes cibles, et par conséquence, une activation de l'apoptose dans les lymphocytes T $CD4^+$ activés [Tiede et al. 2003, Cara et al. 2004, Chouchana et al. 2012, Fong et al. 2015]. Cette inhibition de l'activation des lymphocytes T permet l'induction de la tolérance à l'allogreffe par diminution de la prolifération des lymphocytes T et une induction de l'apoptose, mais aussi dans le cas des MICI une diminution de l'inflammation dans le tube digestif [Tiede et al. 2003, Taylor et al. 2005, Thomas et al. 2005, Chouchana et al. 2012].

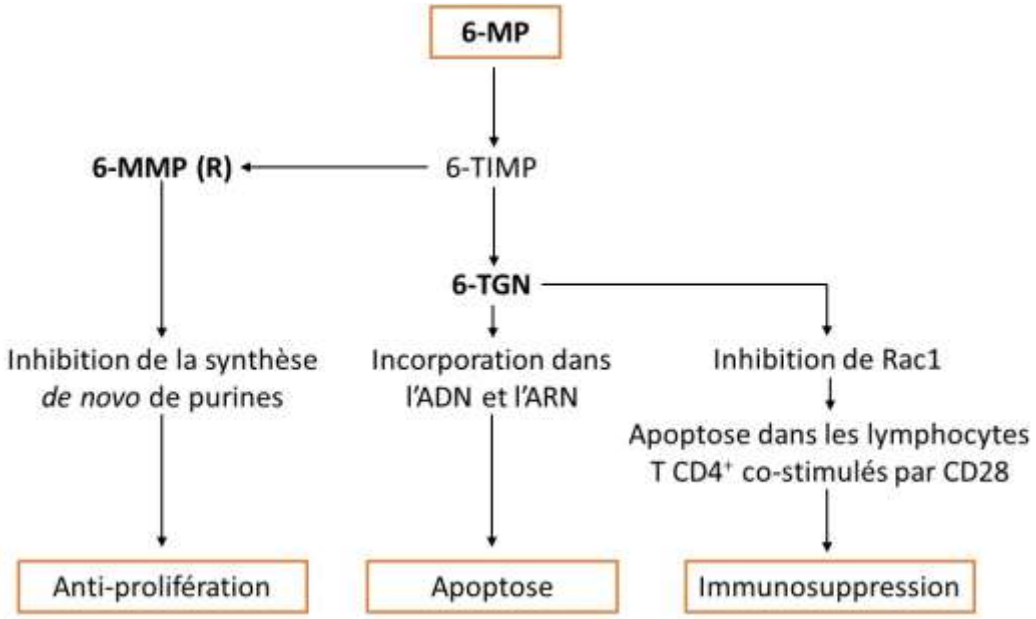


Figure 17. Effets cellulaires de la 6-MP et de ses principaux métabolites.
La 6-MP est métabolisée en 6-TIMP, qui ensuite peut être transformée en 6-MMP(R) ou 6-TGN. Les 6-MMP (R) inhibent la synthèse *de novo* de purines, avec des effets antiprolifératifs. Les 6-TGN peuvent s'incorporer dans l'ADN et l'ARN et inhiber Rac1, favorisant ainsi l'apoptose des lymphocytes T $CD4^+$ co-stimulés par CD28 à l'origine des effets immunomodulateurs. 6-MMP (R): 6-méthylmercaptopurine; 6-MP: 6-mercaptopurine; 6-TGN: 6-thioguanine nucléotides; 6-TIMP: 6-thioinosine monophosphate.

- Pharmacogénétique

Dans le cas des thiopurines, son métabolisme complexe présente une variabilité interindividuelle importante se traduisant par une réponse clinique hétérogène, en termes d'efficacité et de toxicité. La variabilité génétique de la réponse aux thiopurines est principalement sous la dépendance de la TPMT [Cara et al. 2004, Chouchana et al. 2012].

La TPMT est une enzyme cytosolique qui catalyse la méthylation des cycles aromatiques, plus particulièrement des thiopurines, en utilisant la SAM comme donneur de méthyle, cofacteur indispensable de la TPMT [Chouchana et al. 2012]. La variabilité enzymatique interindividuelle de l'activité TPMT est en lien avec la présence de polymorphismes génétiques (SNP, de l'anglais, single nucleotide polymorphism) sur le gène *TPMT* [Szumlanski et al. 1996, Otterness et al. 1997]. A ce jour, plus de 40 variants alléliques ont été identifiés qui modifient la stabilité de la protéine ou l'activité enzymatique [Fong et al. 2015]. Dans la population générale, l'activité de la TPMT présente une distribution trimodale: environ 90% des individus ont une activité normale ou élevée (phénotype rapide, homozygote sauvage), 10% ont une activité intermédiaire (phénotype intermédiaire, hétérozygote) et 0,3%-0,5% ont une activité indétectable ou basse (phénotype lent, homozygote déficient) [Chouchana et al. 2012, Fong et al. 2015]. Un déficit complet de la TPMT est associé à une augmentation de la production des métabolites pharmacologiquement actifs mais dont l'accumulation excessive va être à l'origine de la toxicité [Fong et al. 2015].

Le statut de la TPMT peut être déterminé par génotypage (à partir d'ADN extrait de cellules sanguines circulantes) ou phénotypage dans les globules rouges. La détection du polymorphisme et la modification de la dose à administrer en conséquence, n'est pas encore réalisée dans tous les centres, bien que ces tests puissent être réalisés en routine [Taylor et al. 2005, Fong et al. 2015]. Actuellement, des sociétés savantes internationales comme le CPIC (Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium) recommandent la recherche d'un déficit en TPMT basée sur l'identification des variants alléliques *TPMT**2, *TPMT**3A, *TPMT**3B, *TPMT**3C et/ou sur le phénotypage de la TPMT permettant la classification des individus en fonction de leur capacité métabolique [Relling et al. 2011]. En fonction de l'activité de la TPMT, la posologie initiale de la 6-MP (ou de l'azathioprine) pourra être réduite pour minimiser le risque toxique. Chez les patients ayant une activité TPMT élevée, une dose standard sera administrée, tandis que chez les patients avec une activité TPMT intermédiaire, une diminution de 30-70% de la dose standard sera prescrite. Chez les patients ayant une activité basse ou indétectable, une alternative thérapeutique doit être envisagée ou une dose réduite de 90% par rapport à la dose standard [Chouchana 2014]. Plusieurs études montrent qu'un ajustement de la dose en fonction de la TPMT et/ou de la concentration des métabolites de 6-TGN permet d'optimiser le traitement, c'est-à-dire, réduire les effets secondaires et augmenter l'efficacité. Cependant, actuellement, le dépistage d'un déficit en TPMT n'est pas obligatoire pour la prescription des thiopurines dans les pays de l'Union Européenne [Chouchana et al. 2012, Moon and Loftus 2016].

En plus de la TPMT, d'autres enzymes impliquées dans le métabolisme des thiopurines sont également sous la dépendance de polymorphismes génétiques. On peut citer tout particulièrement l'ITPA, les GST, les SAM, la XO, l'AXO, la 5,10-méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR), l'HPRT et l'IMPDH, par exemple [Chouchana et al. 2012, Fong et al. 2015]. Des études sont en cours pour démontrer leur intérêt en clinique afin de sécuriser la prescription des thiopurines.

Plus récemment, des variations alléliques du gène *NUDT15* (nudix hydrolase 15) ont été identifiées comme un facteur important d'intolérance et de susceptibilité à développer une myélotoxicité sous thiopurines. Le mécanisme de survenue de ces toxicités repose sur le fait que NUDT15 inactive les métabolites des thiopurines et diminue la cytotoxicité *in vitro*, alors que chez les patients ayant une déficience de NUDT15 associée à une variation génétique (p.Arg139Cys, p.Arg139His, p.Val181Leu ou p.Val18-Val19insGlyVal) on observe une augmentation des 6-TGN expliquant une augmentation de la myélotoxicité [Moriyama et al. 2016, Rudin et al. 2017, Woillard et al. 2017, Yin et al. 2017]. Ces variations génétiques très rares chez les Caucasiens sont plus fréquentes dans les populations asiatiques, représentant la cause génétique principale de la toxicité aux thiopurines alors que dans ces populations les polymorphismes de la TPMT sont rares [Moriyama et al. 2016].

IV.1.4. Indications thérapeutiques

Bien que l'azathioprine soit le précurseur de la 6-MP ces molécules sont indiquées dans des contextes pathologiques différents. L'azathioprine est principalement indiquée au cours de la greffe d'organes (majoritairement le rein) et dans les MICI, alors que la 6-MP est principalement prescrite dans des maladies auto-immunes et dans les leucémies de l'enfant et de l'adulte.

- Maladies auto-immunes

La 6-MP est indiquée dans les formes sévères de maladies auto-immunes chez des patients intolérants aux corticoïdes, comme dans la polyarthrite rhumatoïde sévère, le LED, l'hépatite auto-immune, l'anémie hémolytique auto-immune et la myasthénie [Karran and Attard 2008, ANSM 2010].

La posologie habituelle de la 6-MP dans les maladies auto-immunes est de 1 à 3 mg/kg/jour sans excéder 150 mg/jour en fonction de l'état clinique, de la réponse individuelle et de la tolérance hématologique [ANSM 2010, Chouchana et al. 2012]. La posologie d'entretien sera réduite au minimum pour maintenir l'efficacité [ANSM 2010].

- MICI

Dans les MICI, la posologie initiale de l'azathioprine varie habituellement entre 1 et 3 mg/kg/jour chez les patients avec des formes modérées à sévères chez qui une corticothérapie est nécessaire [ANSM 2010, Chouchana et al. 2012, ANSM 2016b]. L'azathioprine est prescrite dans le maintien de la rémission dans la maladie de Crohn active [Chouchana et al. 2012, Chande et al. 2013].

- Transplantation rénale

L'azathioprine est indiquée dans la transplantation d'organes pour prévenir le rejet du greffon chez l'adulte et l'enfant en association avec des corticostéroïdes ou d'autres agents immunosuppresseurs selon une posologie variant de 1 à 3 mg/kg/jour (sans dépasser les 150 mg/jour) mais elle doit être adaptée en fonction de la réponse clinique et de la tolérance hématologique [ANSM 2010].

Elle est actuellement un médicament de deuxième ligne après le mycophénolate mofetil (MMF) dans la phase d'entretien pour la prévention du rejet après transplantation d'un organe solide [Allison 2000, Hartono et al. 2013, Fernández-Ramos et al. 2016].

- Leucémies

La 6-MP est indiquée dans les traitements des LAL, des leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) et des leucémies myéloïdes chroniques (LMC) chez l'adulte et l'enfant. Pour les leucémies aiguës, la dose préconisée est de 1 à 2,5 mg/kg/jour soit 20-30 mg/m^2 à 50-75 mg/m^2 de surface corporelle par jour. Elle peut atteindre dans certains cas 5 mg/kg/jour. La dose sera modifiée en fonction des hémogrammes répétés et en cas d'insuffisance hépatique. Dans les LMC, la dose peut être comprise entre 1,5 et 2,5 mg/kg/jour [Chouchana et al. 2012, ANSM 2013].

La LAL est un cancer des progéniteurs lymphoïdes immatures [Mei et al. 2015]. Elle peut survenir chez les enfants et les adultes, mais le pic d'incidence se trouve à un âge compris entre 2 et 5 ans. Le déclenchement de la maladie est multifactoriel incluant des facteurs génétiques, environnementaux et des facteurs endogènes [Inaba et al. 2013]. La LAL est le cancer le plus fréquent chez les enfants et les adolescents [Pui and Evans 2006]. Approximativement, 3 000 nouveaux cas d'enfants sont diagnostiqués chaque année aux Etats-Unis et 5 000 en Europe.

Le MTX, un analogue de l'acide folique, a été le premier anti-métabolite avec des effets sur la rémission dans la leucémie [Giverhaug et al. 1999, Allison 2000, Benedek 2010]. L'introduction du MTX a augmenté la survie d'un an chez 5% à 30% des enfants atteints de LAL, ce taux passant à 50% avec la découverte de la 6-MP [Giverhaug et al. 1999]. Au cours des 50 dernières années, la survie à 5 ans a augmenté de 40% en 1960 à 90% au milieu des années 2000, grâce à une optimisation thérapeutique des médicaments existants et aux nouveaux traitements [Inaba et al. 2013, Mei et al. 2015]. Malgré ces progrès, la rémission à long terme est inférieure à 50% pour tous les âges confondus [Mei et al. 2015].

Classiquement, les LAL sont classées en 3 groupes: précurseurs de la leucémie des cellules T, précurseurs de la leucémie des cellules B et leucémies matures (de Burkitt) [Mei et al. 2015]. Dans la LAL à cellules B matures, la chimiothérapie est intense et de courte durée [Pui and Evans 2006]. Pour les autres sous-types de LAL, le traitement dure entre 2 et 3 ans avec 3 étapes principales: i) induction de la rémission, ii) intensification ou consolidation et iii) entretien ou continuation. La 6-MP et le MTX sont utilisés en combinaison à fortes doses dans l'étape de consolidation pour éradiquer les cellules leucémiques persistantes pendant 20 à 30 semaines. Le MTX en administration hebdomadaire et la 6-MP en traitement quotidien sont aussi indiqués dans la phase d'entretien pendant 2 ans, en combinaison avec d'autres médicaments [Inaba et al. 2013, Mei et al. 2015]. Après presque 70 ans de commercialisation, le MTX et la 6-MP constituent encore la base du traitement de première ligne dans la phase d'entretien des LAL [Giverhaug et al. 1999, Rudin et al. 2017].

IV.1.5. Effets indésirables

Les effets indésirables les plus fréquents sont de nature hématologique et gastro-intestinale; ils sont dose-dépendants et réversibles à l'arrêt du traitement [ANSM 2010].

Les intolérances gastro-intestinales, sous forme de douleurs abdominales, nausées et vomissements, représentent plus de la moitié des effets indésirables aux thiopurines, chez 5 à 20% des patients traités [Fraser et al. 2002, Hindorf et al. 2006, ANSM 2010, ANSM 2013]. Ces toxicités digestives sont invalidantes, entraînant parfois l'arrêt du traitement chez environ 10% des patients et pourraient expliquer une mauvaise observance thérapeutique [Hindorf et al. 2006].

La myélotoxicité est l'effet indésirable des thiopurines le plus fréquent à l'origine de leucopénies modérées et de neutropénies qui peuvent apparaître subitement à n'importe quel moment après

deux semaines de traitement [Connell et al. 1993, Bergan et al. 1997, Taylor et al. 2005]. Une numération de la formule sanguine régulière est donc recommandée tout au long du traitement par l'Agence nationale de sécurité du médicament (ANSM) [ANSM 2010]. Aux posologies usuelles, sa prévalence se situe entre 2% et 10,5% des patients traités [Present et al. 1989, Kirschner 1998, ANSM 2010, ANSM 2013].

De plus, les thiopurines peuvent provoquer des toxicités hépatiques, pancréatiques, des infections virales, mycosiques et bactériennes et des néoplasies. Les néoplasies surviennent après traitement prolongé avec les thiopurines et pourraient être la conséquence des cassures des brins d'ADN provoquées par les 6-TGN mais aussi par l'état d'immunosuppression. L'azathioprine a été classée comme carcinogène humain par l'*International Agency of Research on Cancer* (IARC) car des traitements à long terme augmentent le risque de développer des néoplasies [Karran and Attard 2008].

IV.1.6. Effets sur le métabolisme cellulaire

Bien que des liens directs entre la 6-MP et le métabolisme cellulaire n'aient pas été démontrés jusqu'ici, des études suggèrent un lien indirect entre la 6-MP et les voies impliquées dans la reprogrammation métabolique. Ainsi, Yoo et *al.* ont montré que la 6-MP augmente la quantité d'ARNm et la stabilité du facteur HIF-1α identifié comme «checkpoint» métabolique [Yoo et al. 2007]. De plus, des données récentes indiquent que la 6-MP inhibe la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR dans un modèle de cellules murines de la microglie, suggérant qu'elle peut interférer avec les «checkpoints» métaboliques et moduler le métabolisme cellulaire [Huang et al. 2016]. Enfin, il a été montré que la 6-MP modifie l'activité de la famille de récepteurs orphelins nucléaires NR4A, qui régulent le métabolisme du glucose et des lipides [Ordentlich et al. 2003]. De plus la 6-MP inhibe les enzymes impliqués dans la glycolyse, comme la polyphosphate kinase (PPK) et l'HK, ainsi que le relargage de lactate dans la lignée humaine immortalisée avec l'EBV, IM-9 [Rodríguez-Enríquez et al. 2009].

De plus, dans des mitochondries isolées de foie de souris, la 6-MP a un effet inhibiteur direct sur la respiration mitochondriale [Porceddu et al. 2012]. Dans la lignée Jurkat, l'exposition à la 6-thioguanine entraîne un dysfonctionnement mitochondrial et une augmentation des ERO qui peuvent induire des lésions de l'ADN [Zhang et al. 2013]. Tapner MJ et *al*. ont montré que la 6-MP induit un stress oxydatif, une atteinte mitochondriale et une déplétion d'ATP dans des hépatocytes de rat en culture [Tapner et al. 2004]. L'ensemble de ces données suggère un effet direct de la 6-MP sur le métabolisme oxydatif mitochondrial, indépendant des «checkpoints» métaboliques.

Les données de la littérature et les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse pour la 6-MP (**Article 2**) peuvent permettre à terme de mieux rationaliser les combinaisons de médicaments à

visée antiproliférative pour contrôler le métabolisme cellulaire et optimiser la prise en charge thérapeutique des patients atteints de LAL et de MICI.

IV.2. L'acide mycophénolique

IV.2.1. Découverte de l'acide mycophénolique

Le MPA a été isolé par Bartolomeo Gosio en 1896 de la culture du bouillon de maïs contenant *Penicillum* dans le but d'être utilisé comme un antibiotique dirigé contre le Bacillus d'anthrax (*Bacillus anthracis*), mais le MPA avait une faible activité antibactérienne. En 1960, des scientifiques ont découvert que le MPA inhibait l'IMPDH et la prolifération de certaines cellules cancéreuses [Allison 2000, Regueira et al. 2011]. Au moment de ces découvertes, l'azathioprine et la ciclosporine étaient déjà sur le marché mais, l'incidence de rejet était encore très importante, notamment en raison de la néphrotoxicité de la ciclosporine [Allison and Eugui 2000]. L'identification de nouvelles molécules immunosuppressives était donc un enjeu très important avec pour objectif la mise au point d'un traitement avec des effets cytostatiques réversibles, d'action plus spécifique vis-à-vis des lymphocytes, dénué d'hépatotoxicité et de néphrotoxicité pour limiter les rejets. Dans ce contexte les chercheurs ont testé les effets du MPA sur l'activité IMPDH lymphocytaire puis évalué ses effets immunosuppresseurs dans des essais cliniques [Allison and Eugui 2000].

À la fin des années 1990, le MMF (CellCept®, Roche), la pro-drogue du MPA, a été commercialisée comme agent immunosuppresseur pour prévenir le rejet dans l'allogreffe. Des études ultérieures ont été réalisées pour rechercher d'autres indications pour le MMF [Allison 2000, Barraclough et al. 2010]. Par la suite, le mycophénolate sodium (MPS, Myfortic®, Novartis) a été synthétisé et commercialisé en 2003 avec des caractéristiques pharmacocinétiques différentes et diminuant les effets secondaires gastriques du MPA [Kho et al. 2011, Rahman et al. 2013].

IV.2.2. Structures chimiques

Le MMF et le MPS sont des pro-drogues du MPA (**Figure 18**), un inhibiteur réversible de l'IMPDH eucaryote [Allison and Eugui 2000, Taylor et al. 2005]. Le MMF est l'ester 2-morpholinoéthylique du MPA [Allison and Eugui 2000, EMA 2015a]. Les trois médicaments appartiennent à la classe des immunosuppresseurs anti-métabolites qui inhibent la synthèse de l'ADN (comme les thiopurines) [Wiseman 2016].

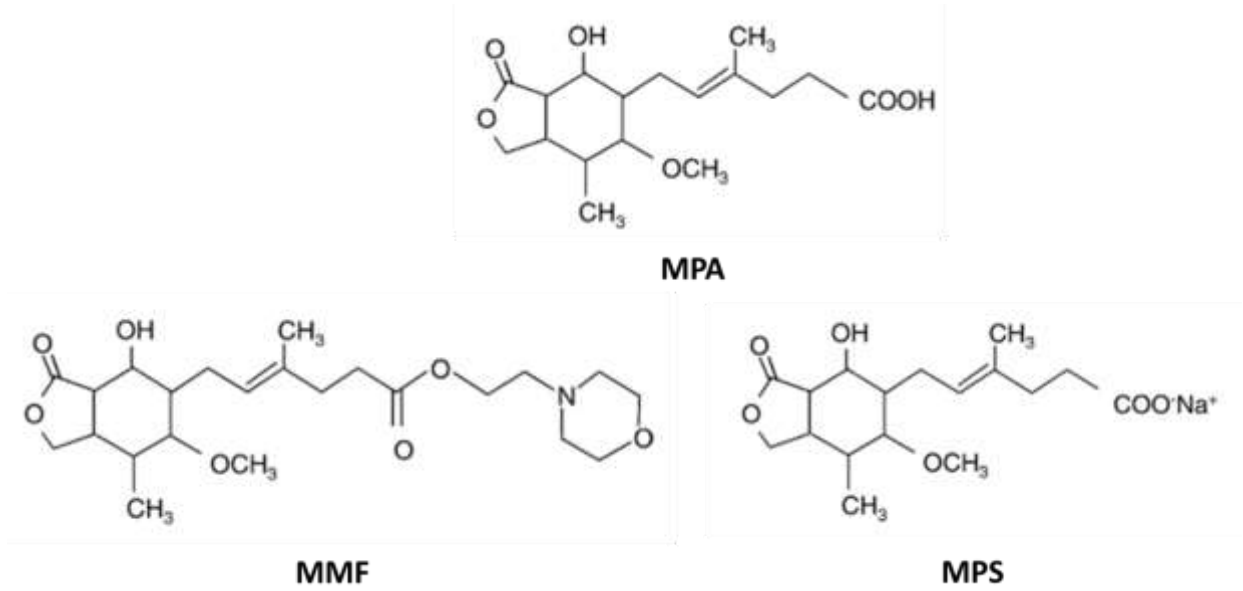


Figure 18. Structures chimiques du MPA, MMF et MPS.
MMF: mycophénolate mofetil; MPA: acide mycophénolique; MPS: mycophénolate sodium. De: [Taylor et al. 2005].

IV.2.3. Propriétés pharmacologiques

- Pharmacocinétique

Après administration orale, le MMF est rapidement hydrolysé en MPA par les estérases dans le foie, l'estomac, l'intestin grêle, le sang et divers tissus [Taylor et al. 2005, Staatz and Tett 2007, Kho et al. 2011, Rahman et al. 2013]. Le MPS a été formulé pour diminuer les effets secondaires gastriques car le MPA est relargué plus tard dans l'intestin grêle [Rahman et al. 2013]. La biodisponibilité orale du MPA se situe entre 80-94% pour le MMF et 72% pour le MPS [Staatz and Tett 2007]. Après absorption, le MPA se fixe à l'albumine, la fraction liée représentant 97-99% de la totalité chez les patients présentant une fonction rénale et hépatique normale [Staatz and Tett 2007]. La forme active, le MPA, a une demi-vie de 18 heures.

Le MPA est converti dans le foie par des UDP-glucuronosyltransférases (UGT) en son métabolite inactif, l'acide glucuronide 7-O-mycophénolique (MPAG), éliminé principalement dans les urines [Allison and Eugui 2000, Taylor et al. 2005, Kho et al. 2011, Rahman et al. 2013]. L'étape de glucuronidation d'une molécule aboutit généralement à la formation d'un métabolite plus hydrophile, normalement moins actif ou inactif qui peut être excrété plus facilement dans les urines ou la bile [Barraclough et al. 2010]. Le métabolite conjugué MPAG peut suivre ensuite 3 voies d'élimination: l'excrétion urinaire principalement (87%); l'excrétion biliaire vers l'intestin suivie d'un cycle entéro-hépatique; le passage dans la bile et l'élimination dans les fèces [Allison and Eugui 2000, EMA 2015a]. L'excrétion urinaire fait intervenir les transporteurs organiques d'anions (OAT, de l'anglais, organic anion transporter) et la protéine de multi-résistance 2 (MRP-2, de l'anglais, multidrug resistance-associated protein 2) au niveau du tubule rénal [Rahman et al.

2013]. Au cours de la circulation entéro-hépatique, le MPAG est transporté du sang vers les hépatocytes par les transporteurs organiques de polypeptides anioniques (OATP, de l'anglais, organic anion-transporting polypeptide) et l'excrétion biliaire est dépendante du transporteur MRP-2 [Rahman et al. 2013]. Après le passage dans la bile, 6% du MPAG est retrouvé dans les fèces, et le reste subit une étape de déconjugaison en MPA par les bactéries de l'intestin pour être réabsorbé dans la circulation systémique. A la suite du cycle entéro-hépatique, on observe des pics secondaires de la concentration plasmatique du MPA entre 6 et 12 heures après l'administration [Rahman et al. 2013, EMA 2015a]. La recirculation entéro-hépatique représente approximativement 40% de l'exposition au MPA [Staatz and Tett 2007] et peut contribuer à son intolérance gastro-intestinale [Allison and Eugui 2000, Taylor et al. 2005, Kho et al. 2011, Rahman et al. 2013].

Le MPAG est le métabolite inactif principal, mais il existe trois autres composés minoritaires, produits sous l'action de différents enzymes de la famille UGT, le métabolite acyl glucuronide (AcMPAG) et deux dérivés glucosides inactifs. En ce qui concerne l'AcMPAG, *in vitro* il inhibe l'IMPDH avec une puissance similaire au MPA et avec des effets inhibiteurs sur la prolifération lymphocytaire. De plus, des données *in vitro* et *in vivo* suggèrent que l'AcMPAG contribue à la toxicité du MPA [Barraclough et al. 2010].

- Pharmacodynamie

Le MPA cible spécifiquement et de manière réversible l'IMPDH, une enzyme limitante dans la synthèse *de novo* des nucléotides à guanosine (purines), essentiels pour la synthèse d'ADN et ARN et indispensables à la prolifération cellulaire (**Figure 19**). La plupart des types cellulaires peuvent générer des purines par la voie de l'IMPDH et la synthèse *de novo* ainsi que la voie de sauvetage des purines. Étant donné que la prolifération des lymphocytes T et B est essentiellement dépendante de la synthèse *de novo*, le MPA a un effet cytostatique plus marqué sur ces populations lymphocytaires [Allison and Eugui 2000, Taylor et al. 2005, Kho et al. 2011, EMA 2015a, Wiseman 2016].

L'IMPDH existe sur deux isoformes différentes, l'isoforme de type I, retrouvée dans les cellules quiescentes, et l'isoforme de type II dans les lymphocytes activés. L'activité inhibitrice du MPA est cinq fois plus puissante vis-à-vis de l'IMPDH de type II, ce qui constitue son mécanisme principal pour exercer son effet immunosuppresseur [Allison and Eugui 2000, Taylor et al. 2005].

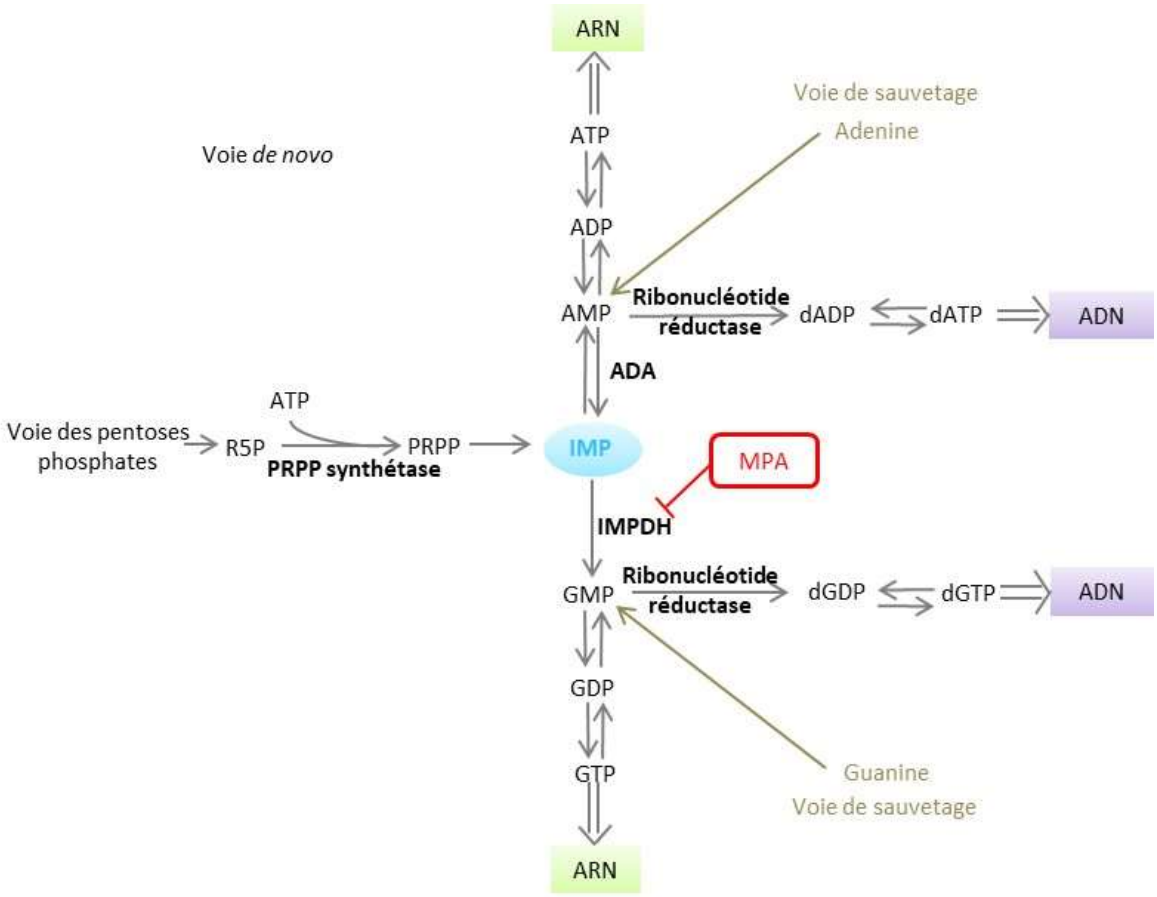


Figure 19. Voie de synthèse des purines et action du MPA.
La voie des pentoses phosphates peut donner le R5P, qui grâce à l'action de la PRPP synthétase est transformé en PRPP, puis ensuite en IMP. L'IMP est transformé en GMP par l'IMDPH (cible du MPA) ou en AMP par ADA. Par différentes réactions, le GDP, le GTP, l'ADP et l'ATP sont produits pour former l'ARN ainsi que le dGDP, le dGTP, le dADP et le dATP sont produits pour former l'ADN. De plus, la voie de sauvetage peut donner de l'adénine ou de la guanine pour générer l'AMP ou le GMP. ADA: adenosine deaminase; ADP: adenosine diphosphate; AMP: adenosine monophosphate; ATP: adenosine triphosphate; dADP: deoxyadenosine diphosphate; dATP: deoxyadenosine triphosphate; dGDP: deoxyguanine diphosphate; dGTP: deoxyguanine triphosphate; GDP: guanosine diphosphate; GMP: guanosine monophosphate; GTP: guanosine triphosphate; IMP: inosine monophosphate; IMPDH: IMP deshydrogenase; MPA: acide mycophénolique; PP pathway: pentose phosphate pathway; PRPP synthetase: 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate synthetase; PRPP: 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate; R5P: ribose-5-phosphate. Modifié de: [Fernández-Ramos et al. 2016]

Le MPA, *via* l'inhibition de l'IMPDH, bloque le signal 3 d'activation lymphocytaire cytokine-dépendant, c'est-à-dire, la prolifération lymphocytaire IL-2 dépendante mais sans inhiber ni la survie cellulaire ni l'apoptose *via* la voie Fas des lymphocytes activés [Allison and Eugui 2000, Quéméneur et al. 2002, Kho et al. 2011].

Cependant, le MPA pourrait induire l'apoptose des cellules T activées et supprimer la glycosylation par inhibition du transfert du fucose et du mannose aux glycoprotéines car les intermédiaires des nucléotides sont nécessaires. L'inhibition de la glycosylation en particulier des molécules

d'adhésion entraîne une diminution du recrutement des lymphocytes dans les sites d'inflammation [Allison and Eugui 2000].

- Pharmacogénétique

L'identification des SNP des gènes qui codent pour les transporteurs ou les enzymes du métabolisme des médicaments peut permettre la prédiction de la réponse aux traitements. Pour le MPA, plusieurs SNP ont été identifiés dans les gènes codant pour l'UGT, l'OATP, la MRP-2 et l'IMPDH, qui sont impliqués dans la distribution, le métabolisme et l'action pharmacologique du MPA [Barraclough et al. 2010].

Plusieurs membres de la famille des UGT ont été identifiés comme ayant un rôle dans le métabolisme du MPA. Des données controversées suggèrent que deux polymorphismes de l'*UGT1A9*, en position c.-2152 C>T et c.-275 T>A, ont un impact clinique important. Ces variants sont à l'origine d'une diminution de l'exposition au MPA et sont associés à une augmentation du risque de rejet aigu démontré par biopsie pendant la première année post-transplantation, mais seulement dans le sous-groupe recevant MPA avec une dose fixée de tacrolimus. Ces résultats n'ont pas été reproduits dans d'autres études [Barraclough et al. 2010, Woillard et al. 2017].

Actuellement, les tests pharmacogénétiques concernant les enzymes du métabolisme (UGT1A9, 1A8, 2B7), les transporteurs d'efflux (ABCB1, MRP2), les transporteurs d'influx (OATP1B1, OATP1B3) ou les cibles du MPA (IMPDH) ne sont pas recommandés en routine pour le MPA [Woillard et al. 2017].

IV.2.4. Indications thérapeutiques

Selon l'ANSM, le MMF et le MPS sont indiqués dans la prévention des rejets après transplantation d'organes solides (rein, cœur, foie) [EMA 2015a]. Le MMF est également prescrit dans certaines maladies auto-immunes comme le LED (néphropathies lupiques) et dans des maladies neuromusculaires [Chaundry et al. 2001, Appel and Appel 2009, Fassbinder et al. 2015, Wiseman 2016]. Dans les maladies auto-immunes, le MPA a comme action principale de réduire l'activité du système immunitaire et est utilisé comme alternative thérapeutique chez les patients qui ne répondent pas aux autres traitements immunosuppresseurs [Rahman et al. 2013].

- Transplantation rénale

Le MMF est indiqué en association à la ciclosporine et aux corticoïdes, pour la prévention des rejets aigus d'organes chez les patients ayant bénéficié d'une allogreffe rénale, cardiaque ou hépatique [Taylor et al. 2005, EMA 2015a]. En transplantation rénale chez les adultes, le MMF est administré par voie orale dans les 72 heures qui suivent la greffe. La dose quotidienne recommandée est de 2 g répartie en deux prises [EMA 2015a].

Le MPA est un médicament de première ligne dans la prévention des rejets qui a peu à peu remplacé l'azathioprine, malgré le manque de données sur la tolérance à long terme [Allison 2000, Sugiyama et al. 2005, Maripuri and Kasiske 2014, Wiseman 2016].

IV.2.5. Effets indésirables

Bien que la prise en charge des patients ait été améliorée avec une diminution de la survenue de rejets, le MPA présente des effets secondaires importants. Les toxicités sont principalement hématologiques (anémie, leucopénie et thrombopénie) et gastro-intestinales (nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales et gastrites hémorragiques) [Halloran 2004, Taylor et al. 2005, Kho et al. 2011, EMA 2015a]. De plus, le risque d'infections et de néoplasies est augmenté [Staatz and Tett 2007, Barraclough et al. 2010].

IV.2.6. Effets sur le métabolisme cellulaire

Les effets du MPA sur le métabolisme cellulaire font l'objet de recherches récentes. Par exemple, il a été montré que le MPA induit l'anergie des cellules T et la reprogrammation métabolique par suppression de la voie Akt/mTOR [He et al. 2011, Dun et al. 2013]. De plus, des études rapportent un effet du MPA sur certains «checkpoints» métaboliques mais sans pour autant évaluer de façon précise son rôle dans la reprogrammation métabolique. A titre d'exemple, une étude d'association pangénomique (GWAS, de l'anglais, genome-wide association study) a montré que le traitement avec le MPA modifie les voies régulées par Myc et HIF-1α dans les cellules endothéliales, ce qui peut expliquer les effets anti-angiogéniques et anti-tumoraux de ce médicament [Domhan et al. 2008]. Dans un autre modèle cellulaire, le MPA diminue l'expression de Myc et HIF-1α après 12 heures de traitement, suggérant que les effets du MPA sur les «checkpoints» métaboliques dépendent du type cellulaire utilisé dans les études *in vitro*. Enfin, dans une lignée de cancer gastrique, le MPA inhibe la prolifération cellulaire par altération de la voie PI3K/Akt/mTOR [Dun et al. 2014].

Dans les lymphocytes T $CD4^+$, le MPA diminue à la fois l'activation de la voie Akt-mTOR, la glycolyse et la consommation d'oxygène [Morel 2017]. Les effets du MPA sur la mitochondrie ont été étudiés au cours de l'induction de l'apoptose, montrant que le MPA modifie le potentiel membranaire de la mitochondrie [Takebe et al. 2006, Choi et al. 2011]. L'effet du MPA sur le fonctionnement mitochondrial en lien avec la reprogrammation métabolique reste à établir.

Ces résultats, en combinaison avec nos travaux (**Article 3**), mettent en évidence de nouveaux mécanismes d'action du MPA en relation avec son effet antiprolifératif des cellules T dans des modèles *in vitro*; cependant, les conséquences de ces modifications métaboliques en clinique sur le plan de la toxicité ou de l'efficacité à long terme sont encore loin d'être élucidées.

IV.3. Les inhibiteurs de la calcineurine

IV.3.1. Découverte des inhibiteurs de la calcineurine

Les inhibiteurs de la calcineurine sont représentés principalement par la ciclosporine et le tacrolimus. Le succès de ces médicaments est incontestable, puisqu'ils sont présents dans plus de 94% des protocoles de transplantation rénale [Naesens and Sarwal 2010b].

En 1976, une équipe de chercheurs des laboratoires Sandoz (actuellement Novartis) a découvert la ciclosporine (Sandimmun®), un peptide cyclique lipophile isolé d'un champignon, avec des propriétés immunosuppressives [Allison 2000, Halloran 2004, Colombo and Ammirati 2011, Tedesco and Haragsim 2012, Wiseman 2016]. Cette molécule a commencé à être utilisée avant même de connaître son mécanisme d'action précis, puis elle a été classée comme inhibiteur de la calcineurine sans activité cytostatique [Allison 2000, Colombo and Ammirati 2011]. L'introduction de la ciclosporine a révolutionné la transplantation des organes solides entre les années 80 et le début des années 90 [Halloran 2004, Taylor et al. 2005, Legendre et al. 2007, Naesens et al. 2009, Naesens and Sarwal 2010b]. La formulation de microémulsion (Néoral®), mise sur le marché dans les années 90, a amélioré la biodisponibilité de la ciclosporine [Colombo and Ammirati 2011].

La ciclosporine a été le premier inhibiteur de la calcineurine ayant permis une diminution du taux de rejet et une reprise de fonction de l'organe transplanté améliorée [Rath 2013]. Plusieurs études ont démontré une efficacité supérieure de la ciclosporine par rapport à l'azathioprine (50% de survie après un an versus 70-90%) [Taylor et al. 2005, Tedesco and Haragsim 2012]. La ciclosporine est un immunosuppresseur puissant qui inhibe les réactions immunitaires à médiation cellulaire et prolonge la survie des allogreffes de peau, cœur, rein, pancréas, moelle osseuse, intestin grêle ou poumon [ANSM 2014]. Malgré ces bons résultats, le taux de rejet aigu reste élevé avec des effets secondaires à long terme importants [Rath 2013].

En 1987, Kino et *al.* ont découvert un autre inhibiteur de la calcineurine, le tacrolimus (FK506, Prograf®). C'est un antibiotique macrolide qui inhibe la production d'IL-2 et l'activation et la prolifération des lymphocytes T [Allison 2000, Halloran 2004, Bowman and Brennan 2008]. Le tacrolimus a un mécanisme d'action immunosuppresseur similaire à celui de la ciclosporine mais une activité 100 fois plus puissante [Allison 2000, Legendre et al. 2007, Barbarino et al. 2013]. En 1994, le tacrolimus a été approuvé par la FDA et représente actuellement la pierre angulaire dans la thérapie immunosuppressive [Rath 2013]. Le tacrolimus a permis de réduire le risque de rejet aigu, ainsi que le risque de rejet par résistance aux stéroïdes et améliore la reprise de fonction rénale après la greffe par comparaison avec la ciclosporine [Taylor et al. 2005, Rath 2013].

IV.3.2. Structures chimiques

La ciclosporine est un peptide cyclique de 11 acides aminés, qui a été isolé du champignon *Tolypocladium inflatum* avec une masse moléculaire de 1202 Daltons [Allison 2000, Tedesco and Haragsim 2012, Hartono et al. 2013]. Le tacrolimus est un macrolide lactone extrait d'un filtrat de culture de *Streptomyces tsukubaensis* [Allison 2000, Kho et al. 2011, Barbarino et al. 2013] (**Figure 20**). Ces deux composés sont très faiblement solubles et extrêmement lipophiles [Barbarino et al. 2013].

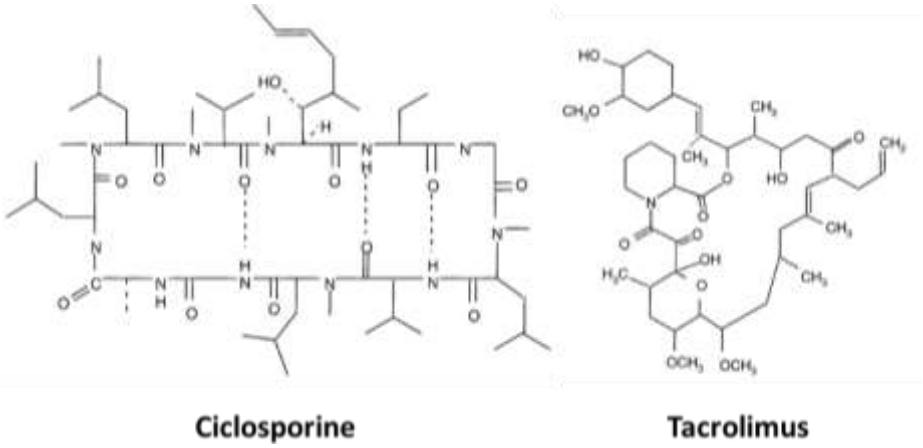


Figure 20. Structure chimique des inhibiteurs de la calcineurine: la ciclosporine et le tacrolimus.
De: [Taylor et al. 2005].

IV.3.3. Propriétés pharmacologiques

- Pharmacocinétique

Après administration orale de la ciclosporine, le pic de concentration sanguine est obtenu en 1 à 2 heures. La biodisponibilité orale absolue après administration est de 20 à 50% [ANSM 2014]. Elle se distribue largement dans l'espace extravasculaire. Dans le sang, la ciclosporine est retrouvée selon la répartition suivante: 5% dans les lymphocytes, 10% dans les granulocytes, 45% dans les hématies et 40% dans le plasma. Environ 90% de la ciclosporine plasmatique est liée aux protéines, principalement des lipoprotéines [Tedesco and Haragsim 2012, ANSM 2014, ANSM 2016a]. La ciclosporine peut être transformée en plus de 25 métabolites différents par monohydroxylation, dihydroxylation ou N-déméthylation sur différentes positions dans la molécule. Les principaux métabolites retrouvés dans la circulation sanguine sont l'AM1 et l'AM9, des produits hydroxylés et l'AM4N, produit N-déméthylé. Le cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) transforme la ciclosporine en AM1, AM9 et AM4N, tandis que le cytochrome P450 3A5 (CYP3A5) peut seulement produire l'AM9. Tous les métabolites de la ciclosporine ont une activité inférieure à celle de la molécule mère [Barbarino et al. 2013, ANSM 2014, ANSM 2016a]. L'élimination est essentiellement biliaire (95%), avec seulement 5% de la dose excrété dans les urines alors que

seulement 0,1% de la dose est excrété dans les urines sous forme inchangée [Tedesco and Haragsim 2012, Barbarino et al. 2013, ANSM 2014].

Après administration orale, le tacrolimus peut être absorbé à tous les niveaux du tractus gastro-intestinal. Les concentrations sanguines maximales sont atteintes entre 1 et 3 heures, avec une biodisponibilité orale moyenne comprise entre 20% et 25% [Bowman and Brennan 2008, ANSM 2012, Rath 2013]. Dans la circulation systémique, le tacrolimus est fortement concentré dans les érythrocytes, avec une proportion de 20:1 par rapport au plasma. Dans le plasma, le tacrolimus est fortement lié (99%) aux protéines plasmatiques [ANSM 2012]. Le tacrolimus est largement métabolisé dans le foie et dans la paroi intestinale principalement par le cytochrome CYP3A4, mais aussi par le CYP3A5. Le tacrolimus peut être transformé en plus de 15 métabolites différents, dont le métabolite majoritaire 13-*O*-déméthyl-tacrolimus moins actif que le tacrolimus et le métabolite mineur, le 31-*O*-deméthyl-tacrolimus ayant une activité immunosuppressive similaire à celle du tacrolimus. Au final, ces métabolites ne contribuent pas à l'activité pharmacologique du tacrolimus [ANSM 2012, Barbarino et al. 2013]. La clairance du tacrolimus est faible, avec une demi-vie longue et variable, étant en moyenne de 43 heures chez les sujets sains [Bowman and Brennan 2008, ANSM 2012]. Le tacrolimus est principalement éliminé dans les fèces par la voie biliaire et un faible pourcentage (2%) se retrouve dans les urines. Moins d'1% du tacrolimus est retrouvé sous forme inchangée dans les urines et les fèces, indiquant que le tacrolimus est presque entièrement métabolisé avant d'être éliminé [Bowman and Brennan 2008, ANSM 2012, Barbarino et al. 2013].

La ciclosporine et le tacrolimus présentent une pharmacocinétique similaire. En effet, après leur captation par les entérocytes, ces composés subissent un métabolisme intestinal par les CYP de la famille 3A. Le tacrolimus est préférentiellement métabolisé par le CYP3A5 et la ciclosporine par le CYP3A4 [Taylor et al. 2005, Barbarino et al. 2013]. Ces médicaments sont secondairement captés par le foie *via* le système porte et pourront être métabolisés par le CYP3A4 et le CYP3A5 hépatiques (**Figure 21**) [Barbarino et al. 2013]. La pharmacocinétique de la ciclosporine et du tacrolimus dépend du transporteur *ABCB1* (ATP-binding cassette sub-family B member 1) codant la P-glycoprotéine (P-gp, de l'anglais P glycoprotein), connue initialement comme le produit du gène de la résistance à différents médicaments 1 (*MDR1*, de l'anglais, multidrug resistance 1). Ce transporteur, présent dans les entérocytes, limite l'absorption intestinale des xénobiotiques, en jouant le rôle de pompe d'efflux [Bowman and Brennan 2008, Barbarino et al. 2013, Rath 2013]. Des variations interindividuelles de réponse à la ciclosporine et au tacrolimus ont été associées à des polymorphismes des gènes *CYP3A4*, *CYP3A5* et *ABCB1*.

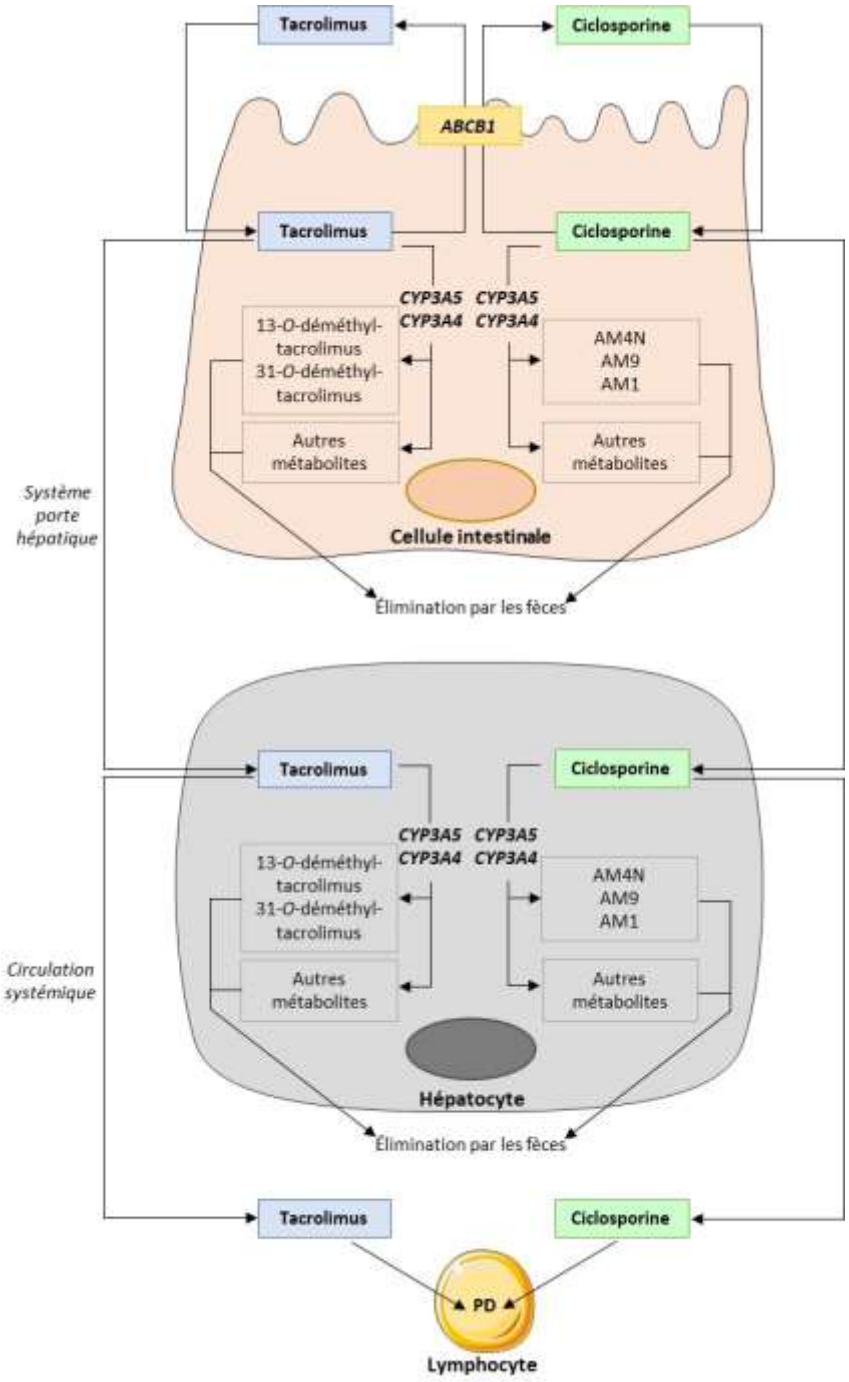


Figure 21. Représentation schématique du métabolisme intestinal et hépatique de la ciclosporine et du tacrolimus.

Le tacrolimus et la ciclosporine entrent dans les cellules intestinales où ils peuvent être métabolisés par le CYP3A4 ou CYP3A5 en des composés qui sont ensuite éliminés par les fèces. Le transporteur ABCB1 codant la P-glycoprotéine va limiter leur passage de la barrière épithéliale intestinale. Après absorption, une fraction de la ciclosporine et du tacrolimus va être captée par les hépatocytes *via* le système porte hépatique. Dans le foie, ces médicaments sont à nouveau métabolisés par les CYP3A et éliminés par les fèces. La fraction des médicaments retrouvée dans la circulation systémique peut exercer son activité pharmacologique vis-à-vis de leur cible cellulaire, les lymphocytes. ABCB1: ATP binding cassette ou P-gp; CYP3A4: cytochrome P450 3A4; CYP3A5: cytochrome P450 3A5; PD: pharmacodynamie. Adaptée de: [Barbarino et al. 2013].

- Pharmacodynamie

La ciclosporine et le tacrolimus exercent leur action immunosuppressive selon plusieurs mécanismes: i) inhibition de la calcineurine, ii) inhibition de la voie JNK (c-Jun N-terminal kinase) et p38 et, iii) augmentation de l'expression du TGF-β1 (**Figure 22**) [Barbarino et al. 2013].

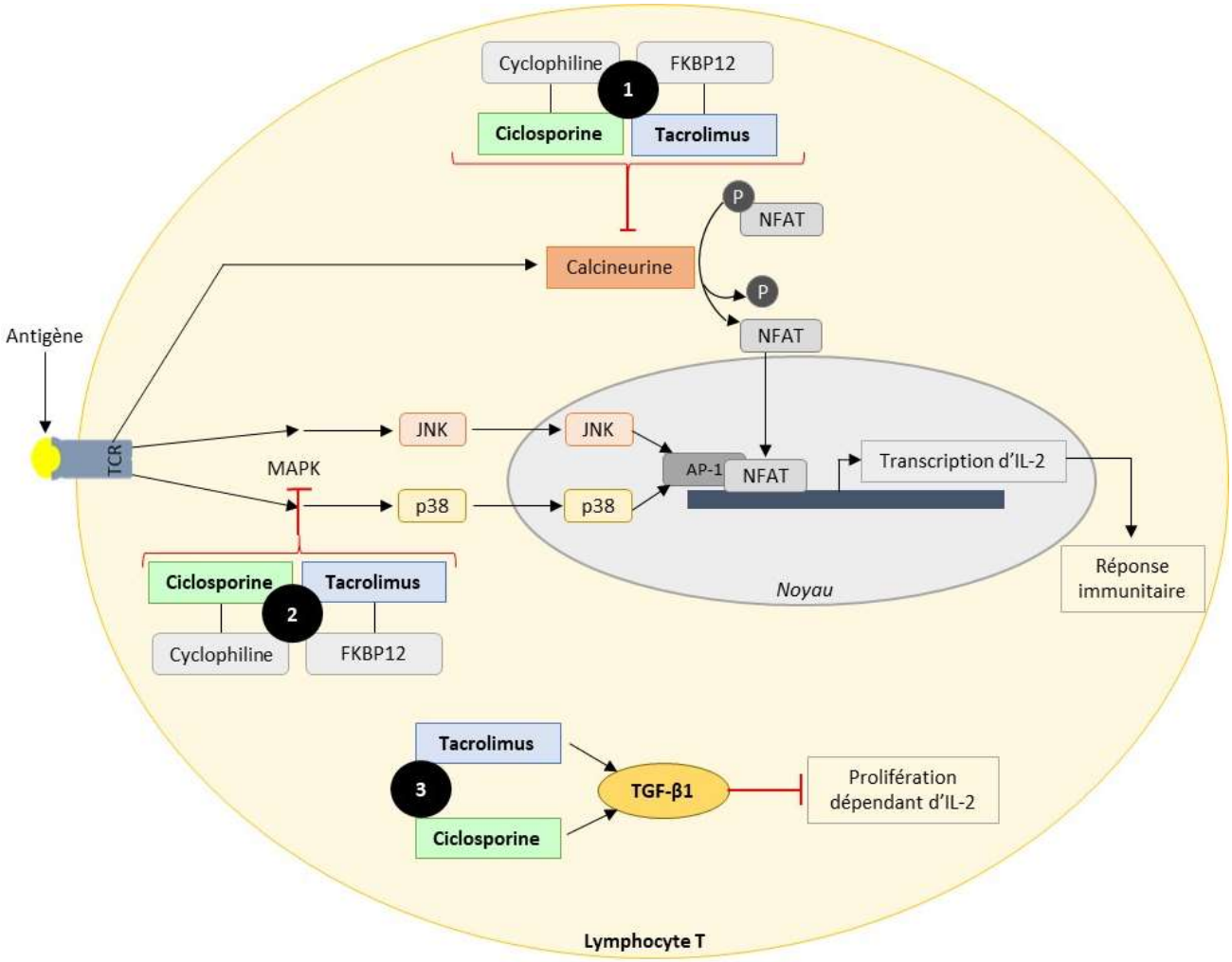


Figure 22. Mécanismes d'action du tacrolimus et de la ciclosporine.
La ciclosporine et le tacrolimus dans les lymphocytes T ont trois principaux mécansimes d'action: 1) les complexes ciclosporine-cyclophiline et tacrolimus-FKBP12 inhibent la calcineurine, qui ne pourra pas déphosphoryler NFAT pour qu'il puisse migrer vers le noyau et promouvoir la transcription d'IL-2; 2) les complexes ciclosporine-cyclophiline et tacrolimus-FKBP12 inhibent les voies des MAPK JNK et p38, ce qui empêche le transfert d'AP-1 dans le noyau pour jouer son rôle de co-facteur de NFAT ; 3) le tacrolimus et la ciclosporine peuvent aussi induire TGF-β1, qui inhibe la prolifération cellulaire dépendante d'IL-2. AP-1: protéine activatrice 1; FKBP12: 12kDa FK506 binding protein); IL-2: interleukine 2; JNK: kinases c-Jun N-terminale; MAPK: mitogen-activated protein kinases; NFAT: facteur nucléaire des lymphocytes T activés; TCR: récepteur des cellules T; TGF-β1: facteur de croissance transformant béta 1. Adaptée de: [Barbarino et al. 2013].

Après l'activation des TCR et des signaux de co-stimulation, trois voies de signalisation intracellulaires sont activées. Une de ces trois voies implique la calcineurine, une protéine phosphatase (également connue sous le nom de PP2B) dont l'activité catalytique dépend de sa liaison à la calmoduline *via* un motif autorégulateur. La calcineurine activée déphosphoryle le facteur NFAT, qui peut migrer vers le noyau. Ce facteur de transcription, en association avec le co-facteur AP-1, agit comme un activateur de la transcription de cytokines pro-inflammatoires comme IL-2, IL-3, IL-4, IFN-γ et TNF-α [Allison 2000, Taylor et al. 2005, Naesens et al. 2009, ANSM 2012, Tedesco and Haragsim 2012, Barbarino et al. 2013, Pouché et al. 2016].

Les inhibiteurs de la calcineurine forment des complexes avec des protéines intracellulaires, les immunophilines, la ciclosporine se fixant à la cyclophiline et le tacrolimus à la FKBP12 (12kDa FK506 binding protein). Les complexes ciclosporine-cyclophiline ou tacrolimus-FKBP12 inhibent l'activité de la calcineurine, empêchant la translocation nucléaire du facteur de transcription NFAT et par voie de conséquence la transcription de ses gènes cibles, les cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, l'expression d'IL-2 est diminuée, ce qui entraîne à la fois le blocage de l'activation et de la prolifération des lymphocytes T cytotoxiques et l'augmentation des lymphocytes T régulateurs [Allison 2000, Halloran 2004, Taylor et al. 2005, ANSM 2012, Barbarino et al. 2013, Rath 2013, ANSM 2014, ANSM 2016a].

Plus récemment, la ciclosporine et le tacrolimus ont été identifiés comme inhibiteurs des voies de signalisation JNK et p38. La voie des MAPK comporte 3 sous-groupes d'enzymes: ERK, JNK et p38. Les deux complexes (ciclosporine-cyclophiline ou tacrolimus-FKBP12) inhibent JNK et p38, mais pas la voie ERK. Ces enzymes sont activées suite à l'activation du TCR et par les signaux de co-stimulation. Ensuite, JNK et p38 migrent dans le noyau pour favoriser la transcription d'IL-2 et d'autres cytokines. La ciclosporine et le tacrolimus inhibant l'expression d'IL-2, vont bloquer l'activation et la prolifération lymphocytaire [Allison 2000, Barbarino et al. 2013].

Finalement, le TGF-β1 est une cytokine clé pour la régulation des cellules du système immunitaire. En effet, le TGF-β1 est un inhibiteur de la prolifération des cellules T dépendantes de l'IL-2. Dans certaines études, après administration de la ciclosporine et/ou tacrolimus, il y a une augmentation à la fois de l'ARNm et de la protéine de TGF-β1. Mais, les conséquences cliniques ne sont pas encore élucidées [Barbarino et al. 2013].

- Pharmacogénétique

L'activité des enzymes CYP3A4, CYP3A5 et du transporteur ABCB1 (ou P-gp) présents dans l'intestin et dans le foie, est susceptible de modifier la biodisponibilité orale et la clairance de la ciclosporine et du tacrolimus [Anglicheau et al. 2004, Jonge and Kuypers 2008, Jonge et al. 2011, Metalidis et al. 2011]. En effet, des variations d'origine génétique de l'activité du CYP3A4, du CYP3A5 et de ABCB1 ont été associées à une variabilité interindividuelle dans la pharmacocinétique des inhibiteurs de la calcineurine [Jonge and Kuypers 2008]. Cependant, les

études analysant l'impact des polymorphismes du *CYP3A4*, *CYP3A5* et de l'*ABCB1* rapportent des résultats parfois discordants.

Pour la ciclosporine, l'impact des polymorphismes du *CYP3A4* ne semble pas très important cliniquement, et de manière spécifique, les variations d'origine environnementale (par phénomène d'induction enzymatique) de l'activité du CYP3A4 sont plus importantes que la variabilité d'origine génétique [Anglicheau et al. 2004, van Gelder et al. 2014]. Plusieurs études montrent une faible corrélation entre les polymorphismes *ABCB1* et la variation de la pharmacocinétique de la ciclosporine [Anglicheau et al. 2004]. Par contre, d'autres études suggèrent que les polymorphismes *ABCB1* pourraient moduler le risque de néphrotoxicité lié au traitement [van Gelder et al. 2014]. A ce jour, l'influence des variants étudiés pour *CYP3A5*, *CYP3A4* et *ABCB1* sur la pharmacocinétique de la ciclosporine reste limitée et le génotypage systématique des patients n'est pas recommandé en routine clinique [Barbarino et al. 2013]. En l'absence de facteurs génétiques prédictifs de la pharmacocinétique de la ciclosporine, la prise en charge thérapeutique des patients recevant de la ciclosporine nécessite un suivi pharmacologique et un ajustement des doses journalières en fonction de la concentration sanguine en sang total [Anglicheau et al. 2004].

A l'inverse, pour le tacrolimus, des études randomisées ont démontré l'intérêt du génotypage du *CYP3A5* pour l'adaptation de la posologie de ce médicament. En effet, si la dose est également ajustée par rapport aux concentrations sanguines du tacrolimus, la zone cible thérapeutique est généralement atteinte après 7 et 10 jours après la greffe, ce qui peut majorer le risque d'épisodes de rejet aigu chez certains patients. Actuellement, il est donc recommandé de génotyper les patients pour le *CYP3A5* dès qu'ils sont inscrits sur la liste d'attente pour la greffe rénale, en vue d'adapter la première dose de tacrolimus en se basant sur le génotype [Jonge and Kuypers 2008, van Gelder et al. 2014].

Les patients porteurs du variant intronique *CYP3A5* 6986A>G (rs 776746, défini comme allèle *CYP3A5**3) sont métaboliseurs lents ou désignés également comme «non expresseurs» et reçoivent une dose 50% inférieure par rapport aux patients «expresseurs» (porteurs de l'allèle non muté *CYP3A5**1). Les patients homozygotes pour l'allèle *3, possèdent une enzyme CYP3A5 non fonctionnelle due à la présence d'un codon stop prématuré aboutissant à une protéine tronquée. Dans ce cas, la dose du tacrolimus doit être réduite en raison du risque augmenté d'une exposition supra-thérapeutique au médicament [Jonge and Kuypers 2008, Barbarino et al. 2013, van Gelder et al. 2014, Flahault et al. 2017]. Cependant, une étude récente chez des patients greffés (suivis 5 ans après la greffe) n'a pas mis en évidence d'influence du génotype *CYP3A5* sur la fonction rénale, la survie du greffon ou la survenue de rejets aigus [Flahault et al. 2017]. Ainsi, le variant *CYP3A5* 6986A>G, qui a un impact majeur sur le métabolisme du tacrolimus, n'a pas de conséquence sur la toxicité à long terme associée à la transplantation [Flahault et al. 2017].

De façon similaire mais avec un effet moindre, des variants du *CYP3A4* ont été décrits comme modulateurs de la pharmacocinétique du tacrolimus, en particulier l'allèle *CYP3A4**22 qui est associé à une diminution de la transcription de l'ARNm. En clinique, les patients porteurs de cet allèle déficient nécessitent une dose réduite de tacrolimus, indépendamment du génotype *CYP3A5* [van Gelder et al. 2014].

IV.3.4. Indications thérapeutiques

La ciclosporine est indiquée dans les greffes pour la prévention du rejet du greffon après transplantation d'organes solides ou pour le traitement du rejet cellulaire chez des patients précédemment traités par d'autres protocoles immunosuppresseurs, ainsi que dans les greffes de moelle osseuse pour la prévention du rejet après allogreffe de la moelle osseuse et greffes de cellules souches. De plus, la ciclosporine est indiquée dans le traitement préventif ou curatif de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD, de l'anglais, graft-versus-host-disease) [ANSM 2014, ANSM 2016a]. La formulation orale de la ciclosporine est utilisée dans les greffes mais aussi «hors greffes», comme dans l'uvéite endogène, les syndromes néphrotiques, la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis et la dermatite atypique [ANSM 2014].

Le tacrolimus est indiqué dans la prévention du rejet du greffon chez les transplantés hépatiques, rénaux ou cardiaques, ainsi que dans le traitement du rejet de l'allogreffe résistant à un traitement par d'autres médicaments immunosuppresseurs [ANSM 2012, Rath 2013].

Dans le contexte de ce travail de thèse, nous développerons essentiellement les indications du tacrolimus dans la transplantation rénale.

- Transplantation rénale

Le traitement avec le tacrolimus par voie orale débute à 0,20-0,30 mg/kg/jour, en deux prises séparées 24 heures après la transplantation. Par voie intraveineuse, le médicament doit être administré en perfusion continue sur 24 heures à une dose initiale de 0,05-0,10mg/kg/jour [ANSM 2012]. Il est administré généralement en association avec d'autres immunosuppresseurs en période initiale postopératoire [ANSM 2012]. Pour les épisodes de rejet, l'augmentation de la posologie du tacrolimus, l'administration de doses supplémentaires de corticoïdes et l'introduction de cures brèves d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux peuvent être préconisées [ANSM 2012]. La posologie du tacrolimus repose essentiellement sur l'évaluation clinique des signes de rejet et de tolérance pour chaque patient. Elle est guidée par la surveillance des concentrations sanguines qui doit être maintenue pour éviter le rejet du greffon [ANSM 2012]. Le tacrolimus, en combinaison avec le MPA est l'association la plus utilisée pour l'entretien de l'immunosuppression dans les deux premières années qui suivent la transplantation [Rath 2013].

En 2000, une première méta-analyse comparant les données cliniques obtenues avec le traitement par tacrolimus ou ciclosporine a été publiée. Dans cette étude, le tacrolimus a été

associé à une diminution des épisodes de rejet aigu mais une augmentation de la prévalence du diabète après la transplantation [Knoll and Bell 1999]. En 2005, une nouvelle méta-analyse a été réalisée en incluant plus de 30 essais cliniques et plus de 4 000 patients. Cette étude a montré une diminution de la perte du greffon après 6 mois chez les patients recevant le tacrolimus par comparaison à ceux traités par la ciclosporine [Webster et al. 2005]. De plus, après un an de suivi, les patients traités avec le tacrolimus présentaient moins de rejet aigu et moins de rejet en lien avec la résistance aux stéroïdes, mais ils développaient davantage de diabète [Bowman and Brennan 2008, Rath 2013]. Sur la base de ces résultats, le tacrolimus est devenu le médicament immunosuppresseur de première ligne en transplantation rénale.

IV.3.5. Effets indésirables

Les inhibiteurs de la calcineurine présentent un grand nombre d'effets secondaires similaires, avec une fréquence et une intensité qui peuvent varier entre eux. Certains effets sont réversibles à l'arrêt du traitement mais d'autres correspondent à des atteintes chroniques irréversibles induites à long terme comme la fibrose interstitielle [Taylor et al. 2005].

La néphrotoxicité aiguë (par dysfonctionnement vasculaire) et chronique (par fibrose) est l'effet indésirable le plus important en cas de traitement par la ciclosporine ou par le tacrolimus. La toxicité observée est la conséquence d'une vasoconstriction sévère de l'artériole afférente, avec une réduction du flux sanguin rénal et du taux de filtration glomérulaire. Avec le tacrolimus, la néphrotoxicité est cependant moins importante qu'avec la ciclosporine [Allison 2000, Halloran 2004, Taylor et al. 2005, Colombo and Ammirati 2011, Tedesco and Haragsim 2012].

Des troubles métaboliques ont été aussi rapportés après le traitement par la ciclosporine et le tacrolimus, avec en particulier une augmentation de l'incidence du diabète (entre 2 et 4 fois plus importante avec le tacrolimus), une hyperkaliémie, une hyperuricémie et une hyperlipidémie. Par ailleurs, des troubles neurologiques peuvent survenir: céphalées, tremblements et insomnies, le plus souvent avec le tacrolimus. L'hypertension constitue également un effet secondaire du tacrolimus et de la ciclosporine [Halloran 2004, Taylor et al. 2005, ANSM 2012, Rath 2013, ANSM 2014, ANSM 2016a].

IV.3.6. Effets sur le métabolisme cellulaire

Des données directes et indirectes suggèrent que les inhibiteurs de la calcineurine peuvent modifier le métabolisme cellulaire. Par exemple, la ciclosporine et le tacrolimus inhibent l'expression protéique du facteur HIF-1α dans une lignée cellulaire HMC (de l'anglais, human mast cell line) au cours de l'hypoxie [Walczak-Drzewiecka et al. 2008]. En relation avec cette hypothèse, la ciclosporine, par inhibition de la calcineurine, qui elle-même inhibe l'ubiquitination et la dégradation protéosomale d'HIF-1α pourrait favoriser la dégradation du facteur HIF-1α [Liu et al. 2007]. De plus, les voies du signal 1 d'activation lymphocytaire interfèrent avec le fonctionnement

des «checkpoints» métaboliques. Le facteur NFAT se fixe sur un site distal du promoteur du gène codant Myc, stimulant la prolifération cellulaire *via* une augmentation de l'expression de Myc [Buchholz et al. 2006, Singh et al. 2010, Mognol et al. 2012, Wang et al. 2012]. Tandis que NFAT contrôle l'expression de gènes impliqués dans l'activation et la différenciation des lymphocytes T, la ciclosporine réduit l'expression de Myc dans les cellules T $CD4^+$ murines [Buchholz et al. 2006, Mognol et al. 2012]. La modulation du métabolisme cellulaire par la voie NFAT/Myc et son inhibition par la ciclosporine paraît plausible mais elle doit être encore démontrée.

Plusieurs études ont démontré que la voie Akt/mTOR est nécessaire pour la transformation tumorale induite par les inhibiteurs de la calcineurine, après la levée de l'inhibition de l'activité de mTORC1 *via* la phosphorylation de PRAS40 dans certaines cellules cancéreuses [Basu et al. 2011, Basu et al. 2012]. Dans l'hippocampe du rat, l'administration de la ciclosporine augmente la phosphorylation d'AMPK sur la position Thr-172, et donc, son activation [Park et al. 2011].

Si la néphrotoxicité est l'un des effets secondaires les plus importants dans le traitement par les inhibiteurs de la calcineurine, d'autres effets secondaires semblent liés à des altérations métaboliques, comme l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie [Taylor et al. 2005]. Radu et *al.* ont montré que le tacrolimus inhibe l'activité de la glucokinase, enzyme limitante de la glycolyse qui permet la phosphorylation du glucose en G6P, aboutissant ainsi à une réduction de la production d'ATP et un stress énergétique, suggérant qu'une modification directe du métabolisme cellulaire par le tacrolimus serait à l'origine de certains de ses effets toxiques [Radu et al. 2004]. Spécifiquement, les inhibiteurs de la calcineurine influencent l'entrée du glucose dans les muscles et le tissu adipeux, le principal mécanisme pour maintenir l'homéostasie du glucose. Dans des adipocytes humains et dans la lignée L6 des myoblastes, ces médicaments inhibent l'entrée du glucose par augmentation de l'endocytose du transporteur de glucose GLUT4, induisant ainsi une résistance à l'insuline et favorisant l'apparition du diabète [Pereira et al. 2014]. Une autre étude utilisant les HUVEC (de l'anglais, human umbilical vein endothelial cells) s'est focalisée sur le dysfonctionnement vasculaire après le traitement par les inhibiteurs de la calcineurine. Dans ce travail, la ciclosporine et le tacrolimus induisaient un dysfonctionnement mitochondrial au niveau des complexes de la chaîne respiratoire II et III, suggérant qu'une partie de la toxicité et du dysfonctionnement vasculaire est la conséquence d'une atteinte mitochondriale [Illsinger et al. 2011a, Illsinger et al. 2011b]. De plus, des altérations métaboliques ont été observées dans le foie, le muscle et les cellules adipocytaires de rats traités par la ciclosporine. Par exemple, la ciclosporine diminue le transport du glucose et l'expression de gènes impliqués dans la lipogenèse (synthèse des lipides) dans les adipocytes, alors qu'elle est associée à une réduction de l'oxydation des acides gras dans le muscle [Fuhrmann et al. 2014]. La ciclosporine bloque l'expression de l'ARNm du transporteur SLC7A5 après l'activation du TCR, à l'origine d'une diminution de l'entrée de leucine dans la cellule, induisant un état d'anergie et inhibant la différenciation des $CD4^+$ et $CD8^+$ [Sinclair et al. 2013]. Dans des mitochondries isolées de rat, le tacrolimus induit une

déplétion d'ATP par un effet sur l'OXPHOS et provoque une altération de la fluidité de la membrane interne de la mitochondrie [Simon et al. 2003].

La compréhension des effets métaboliques de la ciclosporine et du tacrolimus sera une étape importante pour la prévention et la prise en charge des effets secondaires au long cours chez les patients transplantés en vue de diminuer le risque de rejet des greffons.

IV.4. La rapamycine

IV.4.1. Découverte des inhibiteurs de mTOR

La rapamycine (sirolimus, Rapamune®) et l'évérolimus (Certican®, Afinitor® ou Zortress®) sont des immunosuppresseurs classés comme inhibiteurs de mTOR (mTORi) [Taylor et al. 2005].

En 1975, pendant le programme de Wyeth-Ayerst qui visait à découvrir de nouveaux antimicrobiens d'origine naturelle, plusieurs actinobactéries et champignons ont été isolés à partir d'échantillons du sol prélevés dans des zones très différentes. Dans les Îles-de-Pâques (Rapa Nui), une souche de *Streptomyces hygroscopicus* a été collectée, et un principe actif a été isolé, nommé rapamycine (rapa -de Rapa Nui- mycin). Dans un premier temps, la rapamycine a été testée comme antifungique. En 1977, Martel et son équipe ont découvert ses propriétés immunosuppressives. Par la suite, des études ont montré que la rapamycine avait également des propriétés anti-tumorales et antiprolifératives [Allison 2000, Mahalati and Kahan 2001, Sehgal 2003, Kho et al. 2011].

L'étude du mécanisme d'action de la rapamycine a permis de mettre en évidence une nouvelle voie de signalisation. En effet, on a d'abord découvert que la rapamycine formait un complexe avec FKBP12. Puis, dans le modèle *Saccharomyces cerevisiae*, l'étude de la cible du complexe rapamycine-FKBP12 a permis l'identification de la cible de la rapamycine 1 (TOR1) et 2 (TOR2) (de l'anglais, target of rapamycin). Chez les Mammifères, la protéine équivalente a été nommée mTOR [Sehgal 2003, Pallet et al. 2006]. L'indication de la rapamycine pour prévenir le rejet en transplantation rénale a été approuvée en 1999 par la FDA et en 2001 par l'EMA (European Medicines Agency) [Zhao et al. 2016]. Plus tard, afin d'améliorer la biodisponibilité orale de la rapamycine, Schuler et son équipe ont développé un analogue, l'évérolimus [Kho et al. 2011]. Actuellement, d'autres inhibiteurs de mTOR, désignés sous le terme de «rapalogues» sont commercialisés ou en cours d'évaluation dans des essais cliniques.

En plus de ses effets immunosuppresseurs, la rapamycine a été étudiée pour son activité anti-tumorale dans des essais précliniques et cliniques. En effet, la rapamycine inhibe la prolifération ou provoque la mort cellulaire de différentes lignées cellulaires cancéreuses. Spécifiquement, elle inhibe la croissance de lignées de cancers du sein, du côlon et de mélanome [Morath et al. 2007, Seto 2012].

IV.4.2. Structure chimique

La rapamycine ($C_{56}H_{89}NO_{14}$) et l'évérolimus ($C_{53}H_{83}NO_{14}$ ou 40-O-(2-hydroxyéthyl)-sirolimus) sont des lactones macrocycliques et lipophiles. Le sirolimus est produit naturellement par la fermentation de l'actinomycète *Streptomyces hygroscopicus*. L'évérolimus, plus polaire que la rapamycine, a été modifiée pour améliorer son absorption et sa biodisponibilité orale et par conséquent, ses propriétés pharmacocinétiques (**Figure 23**) [Mahalati and Kahan 2001, Sehgal 2003, Kirchner et al. 2004, Taylor et al. 2005, Pallet et al. 2006, Patel and Kobashigawa 2006, Kho et al. 2011].

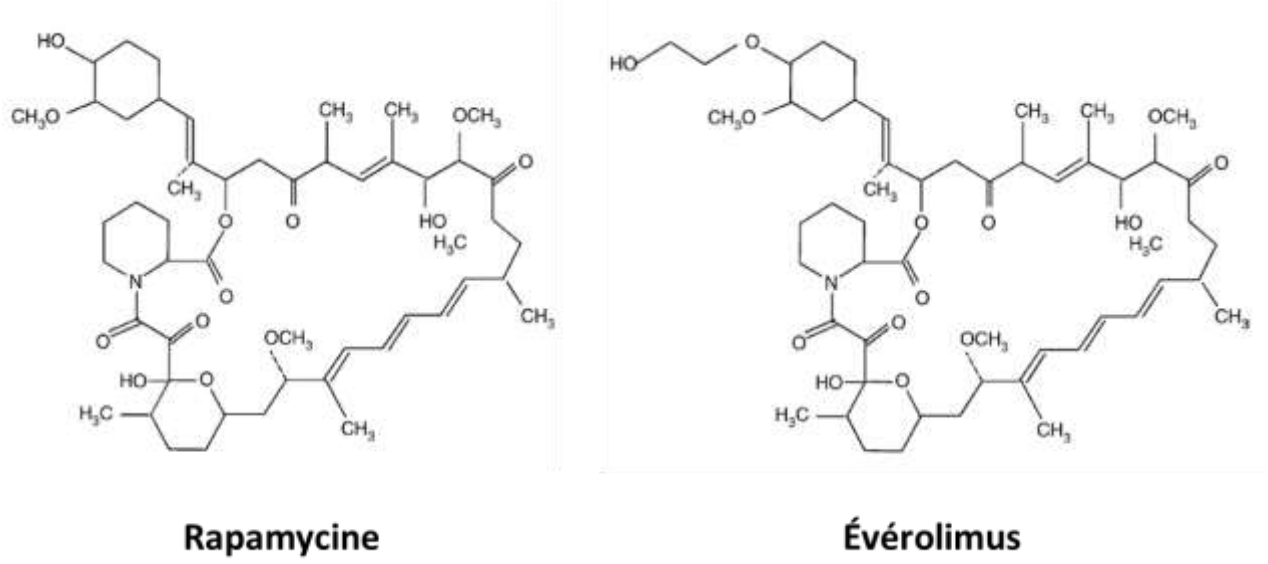


Figure 23. Structures chimiques du rapamycine (sirolimus) et de l'évérolimus.
De: [Taylor et al. 2005]

IV.4.3. Propriétés pharmacologiques

- Pharmacocinétique

Après administration de la solution buvable, la rapamycine est rapidement absorbée, le pic de concentration étant atteint en 1 heure chez les sujets sains recevant des doses uniques et en 2 heures chez les patients avec une allogreffe rénale stable et recevant des doses répétées. La biodisponibilité systémique est estimée à 15%, mais varie en fonction de l'alimentation [Mahalati and Kahan 2001, EMA 2015b, Moes et al. 2015]. La rapamycine étant de nature hydrophobe, elle est distribuée majoritairement dans les érythrocytes (95%), et de façon plus minoritaire dans le plasma, associée aux protéines (3%) ou dans les lymphocytes et granulocytes (2%) [Trepanier et al. 1998, Mahalati and Kahan 2001, Moes et al. 2015]. On estime que 40% de la fraction plasmatique de la rapamycine est fixée aux lipoprotéines [Mahalati and Kahan 2001]. La demi-vie d'élimination chez les patients transplantés rénaux stables est de 60 heures environ.

La rapamycine est transportée par la P-gp et est métabolisée dans les intestins et le foie. Elle est un substrat principalement pour le CYP3A4 mais aussi le CYP3A5, expliquant ainsi des variations interindividuelles dans la biodisponibilité du médicament [Mahalati and Kahan 2001, Taylor et al. 2005, Shihab et al. 2014, EMA 2015b, Moes et al. 2015]. La rapamycine est le composé majoritairement retrouvé dans le sang mais elle peut être retrouvée sous forme de métabolites produits par O-déméthylation et/ou hydroxylation. Au final on identifie 7 métabolites principaux dans le sang, comme par exemple le 16-*O*-déméthyl-sirolimus, le 39-*O*-déméthyl-sirolimus, le 27-39-*O*-diméthyl-sirolimus et le di-hydroxy-sirolimus, avec une activité inférieure à 10% de la rapamycine [EMA 2015b, Moes et al. 2015]. La rapamycine étant métabolisée dans le foie, plus de 90% des métabolites sont excrétés par voie biliaire, et seulement 1% sont retrouvés dans les urines [Moes et al. 2015].

L'évérolimus a une biodisponibilité supérieure à celle de la rapamycine, environ 20% [Shihab et al. 2014, Moes et al. 2015]. L'évérolimus (moins hydrophobe que la rapamycine) se répartit entre les érythrocytes (75%) et le plasma (25%). Il est métabolisé dans le foie pour former 4 métabolites principaux: l'hydroxyl-évérolimus, le dihydroxy-évérolimus, le diméthyl-évérolimus et un anneau ouvert de l'évérolimus. La très grande majorité des métabolites (près de 98%) sont excrétés dans la bile [Moes et al. 2015].

- Pharmacodynamie

La rapamycine et l'évérolimus ont un mode d'action similaire. Ils se fixent sur FKBP12, formant un complexe inhibiteur de mTOR avec FKBP12. Les FKBP sont une famille de protéines intracellulaires, nommées immunophilines avec une fonction cis/trans-peptidylpropyl isomérases (PPIases) [Sehgal 2003]. Le complexe rapamycin-FKBP12 se fixe directement sur mTOR et inhibe son activité [Sehgal 2003, Halloran 2004, Taylor et al. 2005, EMA 2015b].

La protéine mTOR est présente dans les complexes mTORC1 et mTORC2, avec des fonctions cellulaires différentes. Le complexe mTORC1 peut être activé par des variations du pool d'acides aminés, un stress énergétique, la concentration en oxygène, et des facteurs de croissance. L'activation de mTOR favorise la prolifération et la croissance cellulaire en activant la synthèse de protéines, lipides et nucléotides, la biogénèse des ARNm mais aussi par la régulation de l'autophagie. Pour induire la synthèse de protéines, mTORC1 active (par phosphorylation) l'enzyme p70s6k et inhibe (par phosphorylation) le facteur d'initiation eucaryote 4EBP1. Le complexe mTORC2 est activé par des signaux de croissance et intervient dans la régulation de la survie cellulaire et du métabolisme (**Figure 24**) [Pallet et al. 2006, Li et al. 2014, Moes et al. 2015, Pouché et al. 2016]. La rapamycine inhibe principalement le complexe mTORC1 et dans le cas d'une exposition chronique, elle peut aussi inhiber mTORC2 dans certains types cellulaires [Li et al. 2014, Moes et al. 2015]. En conséquence, le traitement avec la rapamycine diminue l'activité traductionnelle, la progression du cycle cellulaire et la prolifération cellulaire [Dumont and Su 1996, Halloran 2004, Taylor et al. 2005, Pallet et al. 2006, Moes et al. 2015].

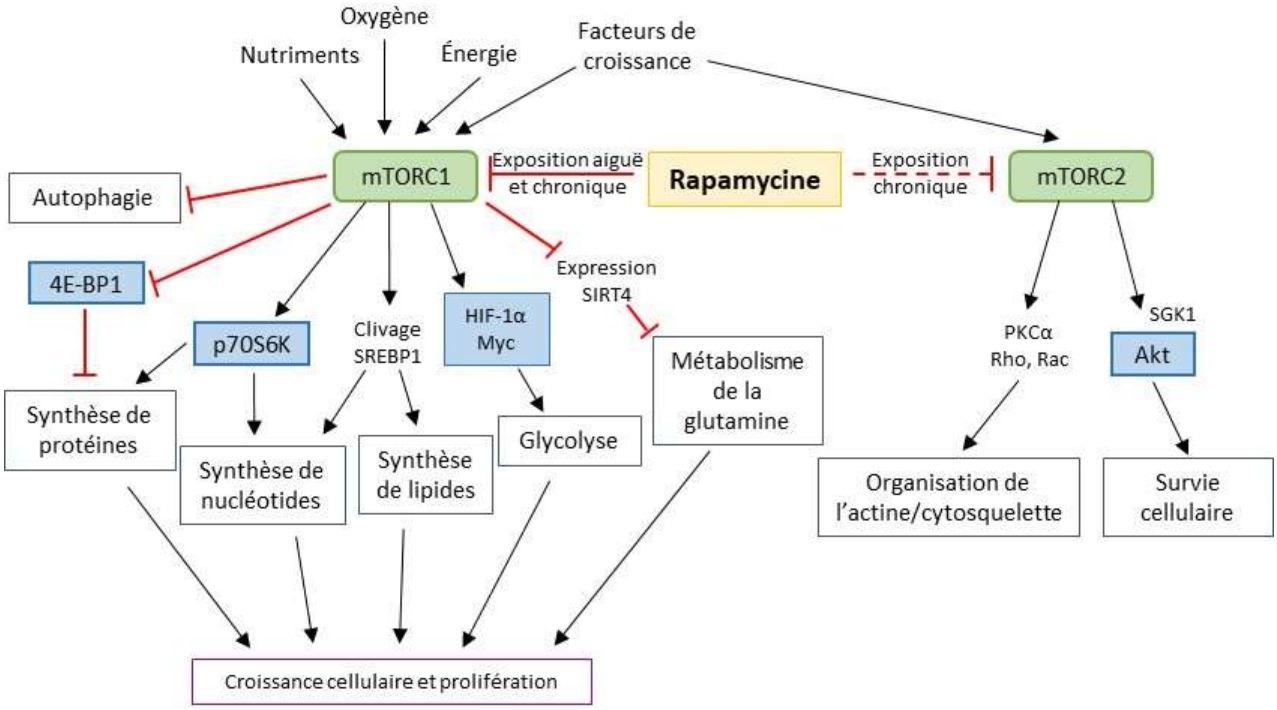


Figure 24. Rôles cellulaires des complexes mTORC1 et mTORC2 et effets de la rapamycine.
Le complexe mTORC1 est activé par l'énergie, l'oxygène, les nutriments et les facteurs de croissance. Il régule négativement l'autophagie mais active la synthèse de protéines, de nucléotides, de lipides, le métabolisme glutaminolytique et la glycolyse pour favoriser la croissance cellulaire et la prolifération. Le complexe mTORC1 peut être inhibé par la rapamycine lors d'une exposition aiguë ou chronique. Le complexe mTORC2 est régulé positivement par les facteurs de croissance et négativement par une exposition chronique à la rapamycine. Il facilite l'organisation de l'actine du cytosquelette et la survie cellulaire. 4E-BP1: eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1; Akt: protein kinase B; HIF-1α: hypoxia inducible factor 1 α; mTORC1: mammalian target of rapamycin complex 1; mTORC2: mammalian target of rapamycin complex 2; P70S6K: ribosomal protein S6 kinase beta-1; PKCα: protein kinase C alpha; SGK1: serine/threonine-protein kinase 1; SIRT4: sirtuin 4; SREBP1: sterol regulatory element-binding protein. Modifiée de: [Pallet et al. 2006, Powell and Delgoffe 2010, Li et al. 2014]

Au cours de l'activation des lymphocytes T, on observe le déclenchement des signaux 1 et 2, entraînant la production d'IL-2 et l'activation de son récepteur à l'IL-2 (IL-2R) exprimé par la même cellule. Les lymphocytes entrent dans une phase de prolifération cellulaire régulée par mTOR (signal 3). Ainsi, la rapamycine inhibe la prolifération et la différenciation des lymphocytes T (et aussi les B), à l'origine d'une immunosuppression et la tolérance au greffon [Dumont and Su 1996, Halloran 2004, Taylor et al. 2005, Pallet et al. 2006, EMA 2015b, Moes et al. 2015, Pouché et al. 2016].

La voie PI3K/Akt/mTOR est cruciale pour la prolifération des lymphocytes T mais aussi pour les cellules cancéreuses, c'est la raison pour laquelle l'inhibition de mTOR par la rapamycine explique son intérêt thérapeutique dans certains cancers [Pallet et al. 2006]. De plus, on observe dans certains types tumoraux une augmentation de mTORC1 en lien avec l'existence de mutations

«gain de fonction» dans des oncogènes comme PI3K, Akt ou Ras, ou «perte de fonction» dans des gènes suppresseurs de tumeurs comme PTEN, LKB1 ou TSC1/2, conférant ainsi aux cellules cancéreuses un avantage pour la prolifération. La rapamycine, en réduisant le métabolisme des cellules tumorales, peut être considérée comme un agent anti-cancéreux [Li et al. 2014].

- Pharmacogénétique

Les patients présentent une variabilité de réponse importante vis-à-vis de la rapamycine et de l'évérolimus. La fenêtre thérapeutique étant très étroite, un suivi thérapeutique pharmacologique est nécessaire. Cependant, en raison d'une demi-vie longue (60 heures), l'adaptation de la posologie en fonction des concentrations sanguines est délicate avant de parvenir à un état d'équilibre chez le patient. L'ajustement de la dose initiale selon les caractéristiques pharmacogénétiques individuelles pourrait être une bonne option pour atteindre plus rapidement la zone cible. La rapamycine et l'évérolimus sont des substrats des enzymes CYP3A4 et CYP3A5 et du transporteur ABCB1 pour lesquels des variations d'origine génétique sont décrites. Cependant, l'analyse de la réponse en fonction des différents polymorphismes présents dans ces gènes n'a pas mis en évidence une association avec la toxicité ou l'efficacité de ces médicaments [Jonge and Kuypers 2008, van Gelder et al. 2014, Moes et al. 2015]. L'analyse des polymorphismes d'autres gènes candidats impliqués dans le mécanisme d'action de la rapamycine et de l'évérolimus pourrait également contribuer à mieux caractériser cette variabilité dans la réponse [Moes et al. 2015].

IV.4.4. Indications thérapeutiques

L'évérolimus est indiqué dans plusieurs types de tumeurs (cancers du sein avancés avec récepteurs hormonaux positifs et tumeurs neuroendocrines d'origine pancréatique et d'origine gastro-intestinale ou pulmonaire)[EMA 2016].

La rapamycine est indiquée chez les patients adultes qui présentent un risque immunologique de faible à modéré recevant une transplantation rénale, en prévention du rejet d'organe [EMA 2015b]. Les effets de la rapamycine étant relativement modestes comme immunosuppresseur et anti-cancéreux, elle est surtout prescrite en combothérapie [Li et al. 2014]. On peut noter que bien que la rapamycine ait une activité antifongique très importante, l'immunosuppression associée n'a pas permis l'utilisation de ce médicament dans ce contexte [Sehgal 2003].

- Transplantation rénale

Au cours du traitement d'initiation (entre 2 et 3 mois après la transplantation), la rapamycine est administrée en dose de charge unique de 6 mg par voie orale dès que possible après la transplantation, suivie d'une dose de 2 mg une fois par jour pendant quelques jours. Ensuite, la dose doit être adaptée individuellement. Elle est recommandée en association avec la ciclosporine et les corticoïdes [Saunders et al. 2001, Legendre et al. 2007, EMA 2015b]. Pour le traitement d'entretien, la ciclosporine doit être progressivement supprimée et la posologie de la rapamycine

ajustée en combinaison avec des corticoïdes [Legendre et al. 2007, EMA 2015b]. Quand la rapamycine est bien tolérée par les patients, elle est indiquée de préférence pour l'entretien de l'immunosuppression après l'allogreffe rénal car elle est moins néphrotoxique que les inhibiteurs de la calcineurine [Morath et al. 2007, Moes et al. 2015].

IV.4.5. Effets indésirables

Entre 20 et 50% des patients interrompent leur traitement par la rapamycine à cause des effets secondaires [Morath et al. 2007]. Les effets indésirables les plus fréquents sont: pneumonie, infection fongique, virale et bactérienne, thrombocytopénie, anémie, leucopénie, fièvre, hypertension, infection du tractus urinaire, diarrhée, constipation, nausée [Kho et al. 2011, EMA 2015b, Moes et al. 2015]. De plus, des altérations du métabolisme ont été retrouvées notamment: hypokaliémie, hypophosphatémie, hypercholestérolémie, hyperlipidémie et hyperglycémie en lien avec l'inhibition de la voie mTOR [Taylor et al. 2005, Kho et al. 2011, EMA 2015b, Moes et al. 2015, Pouché et al. 2016]. Enfin, on observe une augmentation de la survenue de cancers après le traitement par les inhibiteurs de mTOR, possiblement par une diminution de l'activité du système immunitaire vis-à-vis de la tumeur [Patel and Kobashigawa 2006].

IV.4.6. Effets sur le métabolisme cellulaire

Les effets de la rapamycine sur le métabolisme cellulaire sont connus, *via* sa cible mTOR, un «checkpoint» métabolique critique pour la prolifération et l'activation des lymphocytes T mais aussi pour la prolifération des cellules cancéreuses. Un grand nombre d'études ont été publiées concernant les effets de la voie mTOR sur la différenciation lymphocytaire [Powell and Delgoffe 2010, Pollizzi et al. 2015] et certaines ont évalué les effets de la rapamycine sur la modulation du métabolisme lymphocytaire. Par exemple, il a été montré que l'inhibition de mTOR par la rapamycine est associée à une diminution de la glycolyse dans les lymphocytes T, un blocage de la différenciation des lymphocytes T effecteurs $CD4^+$ et en parallèle une augmentation de la génération des lymphocytes Tregs $CD4^+$ et de cellules T mémoire $CD8^+$, qui sont similaires d'un point de vue métabolique [Powell and Delgoffe 2010, Kato and Perl 2014, Li et al. 2015, Pollizzi et al. 2015]. Ces effets expliquent que la rapamycine induit la tolérance par induction des Tregs [Shan et al. 2014].

Comme avec le tacrolimus, la rapamycine induit une déplétion d'ATP par un effet sur l'OXPHOS suite à une modification de la structure membranaire mitochondriale dans un modèle de mitochondries isolées de rat [Simon et al. 2003]. La rapamycine diminue le potentiel membranaire mitochondrial, la consommation d'oxygène et la synthèse d'ATP dans la lignée cellulaire Jurkat [Schieke et al. 2006]. La rapamycine diminue la transcription des gènes impliqués dans l'oxydation mitochondriale. Dans la lignée Jurkat, la rapamycine diminue précocément (dans les 30 min) la production d'ATP *via* la mitochondrie alors qu'elle l'augmente *via* la glycose aérobie. De plus, il y a également une augmentation de la production de lactate [Ramanathan and Schreiber 2009]. Enfin,

dans trois lignées cancéreuses (sein, colon et glioblastome) soumises à une irradiation, la rapamycine inhibe la relocalisation de mTOR dans la mitochondrie et, en conséquence bloque la réorientation de la glycolyse vers l'OXPHOS qui permet aux cellules tumorales de s'adapter à un stress génotoxique [Lu et al. 2015].

La rapamycine a un effet à la fois sur le métabolisme des cellules cancéreuses et sur celles du système immunitaire. D'un côté, la rapamycine diminue la réponse immunitaire (après une allogreffe, dans des maladies inflammatoires, auto-immunes), et de l'autre, elle diminue la prolifération des cellules cancéreuses. Ainsi, elle peut être considérée à la fois comme agent immunosuppresseur et comme agent anticancéreux. Cependant, compte tenu du rôle du système immunitaire dans le microenvironnement tumoral pour limiter la prolifération tumorale l'intérêt de son utilisation comme anti-cancéreux semble limité. En effet, il est connu qu'une tumeur présentant un fort taux d'infiltrat lymphocytaire aura un meilleur pronostic du fait des lymphocytes qui auront une action cytotoxique vis-à-vis des cellules tumorales. Même si le traitement par la rapamycine diminue la prolifération des cellules cancéreuses il va également diminuer le recrutement des lymphocytes T et leur différenciation en T effecteurs. L'inhibition de la réponse immunitaire dans la tumeur va au final contrebalancer les effets antiprolifératifs de la rapamycine sur les cellules cancéreuses. Cela pourrait expliquer pourquoi, même si beaucoup d'essais cliniques ont été initiés pour démontrer ses effets anti-tumoraux, finalement la rapamycine n'est utilisée que dans un nombre très limité de cancers [Chaoul et al. 2015]. Cette divergence dans les résultats en fonction des tumeurs peut aussi être due à la dose, la durée et le moment de l'administration au cours de l'évolution du cancer, les caractéristiques cliniques (localisations, stade) et moléculaires (altérations du génome tumoral conduisant à des dérégulations de voies de signalisation) de la tumeur. Dans ce contexte, certains auteurs pensent que l'efficacité anti-tumorale de la rapamycine pourrait être optimisée en limitant ses effets sur les lymphocytes T infiltrés [Chang and Pearce 2016].

OBJECTIFS

Contexte

Au sein du laboratoire, les travaux de thèse du Dr. Laurent Chouchana (dirigée par le Pr. Marie-Anne Loriot) ont eu pour but d'identifier de nouveaux facteurs prédictifs de la réponse aux thiopurines pour optimiser la prise en charge thérapeutique des patients. En utilisant un modèle de lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCL) sélectionnées pour leur sensibilité ou leur résistance aux thiopurines, une signature transcriptomique de 32 gènes associée à la résistance aux thiopurines a été caractérisée. La comparaison sans *à priori* des profils transcriptomiques des lignées résistantes par rapport aux lignées sensibles a mis en évidence des gènes, impliqués notamment dans la prolifération cellulaire, l'apoptose, le métabolisme cellulaire, qui permettaient de distinguer les lignées sensibles et résistantes.

Parmi ceux-ci le gène *EGLN1*, qui code pour la protéine prolyl-hydroxylase PHD2, était surexprimé dans les LCL résistantes aux thiopurines (**Article 0**). Au vu de son rôle dans la prolifération tumorale, la progression métastatique et dans la résistance aux chimiothérapies anti-cancéreuses PHD2 a suscité beaucoup d'intérêt comme cible thérapeutique potentielle [Brökers et al. 2009, Oliveira et al. 2012, Xu and Huang 2012]. En conditions de normoxie, la protéine PHD2 en hydroxylant deux résidus proline du facteur HIF-1α permet la fixation du facteur VHL puis le signal d'ubiquitination et une dégradation rapide de HIF-1α par le protéasome. A l'inverse, en situation d'hypoxie, l'absence d'oxygène inhibe l'hydroxylation de HIF-1α qui n'est pas dégradé. La translocation de HIF-1α vers le noyau va permettre sa liaison avec HIF-1β pour former un complexe induisant la transcription de gènes cibles pour permettre la survie cellulaire dans ces conditions de stress. L'hypoxie tissulaire régule également les fonctions des cellules de l'immunité et leur différenciation. On sait que HIF-1α influence la différenciation des lymphocytes T. En effet, cette molécule induit l'expression de FOXP3 dans les cellules T $CD4^+$, aboutissant à une expansion des lymphocytes Tregs. HIF-1α est également impliquée dans la différenciation des cellules T en cellules Th17 productrices d'IL-17 [Dang et al. 2011].

Dans ce contexte, j'ai réalisé mon projet de Master 2 dans le but d'étudier les effets de la 6-MP sur la voie du PHD2/HIF-1α dans un modèle *in vitro* de LCL. A partir des données de la littérature et celles issues du laboratoire, nous avons pu faire l'hypothèse que, puisque HIF-1α avait, en plus de sa fonction adaptative au cours du stress hypoxique, un rôle important dans la reprogrammation métabolique, le traitement par la 6-MP, inhibiteur de la synthèse des purines, pouvait modifier le métabolisme cellulaire de manière plus globale. Outre l'étude de la 6-MP, nous avons décidé d'analyser également les effets sur la reprogrammation métabolique d'autres médicaments immunosuppresseurs antiprolifératifs, comme le MPA et la rapamycine en utilisant un modèle de cellules T prolifératives, la lignée humaine Jurkat.

Objectifs

Ce travail de thèse a pour objectifs:

- **i)** L'analyse exhaustive des données émergentes de la littérature sur la reprogrammation métabolique dans les lymphocytes T en intégrant une discussion des effets possibles des médicaments immunosuppresseurs sur le métabolisme des lymphocytes T (**Article 1**);
- **ii)** La caractérisation des effets de la 6-MP sur le métabolisme des lymphocytes T dans une lignée humaine Jurkat, utilisée comme modèle *in vitro* de leucémie aiguë lymphoblastique (**Article 2**);
- **iii)** L'étude des effets du MPA en comparaison avec la rapamycine, un inhibiteur de mTORC1, sur le métabolisme de cellules T prolifératives dans la lignée humaine Jurkat (**Article 3**).

TRAVAUX DE RECHERCHE

Article 0

Bases moléculaires de la résistance aux thiopurines: signature transcriptomique dans des lignées cellulaires lymphoblastoïdes

Laurent Chouchana, [1,2] Ana A. Fernández-Ramos,[1,2] Florent Dumont,[2,3]
Catherine Laurent-Marchetti,[1,2] Irène Ceballos-Picot,[2,5] Philippe Beaune, [1,2,4] David Gurwitz,[6]
Marie-Anne Loriot[1,2,4]

[1] INSERM UMR-S 1147, Centre Universitaire des Saints-Pères, 45 rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France
[2] Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 45, rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France
[3] INSERM U1016, Institut Cochin, 22, rue Mechain, 75014 Paris, France
[4] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Biochimie, 20 rue Leblanc 75015 Paris, France
[5] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker-Enfants Malades, Service de Biochimie Métabolique, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris, France
[6] Department of Human Molecular Genetics and Biochemistry, Sackler Faculty of Medicine, Tel-Aviv University, Tel-Aviv, Israel

Contexte

La 6-MP a été synthétisée dans les années 50 par GB Ellion et G Hitchings. Malgré son ancienneté, elle est encore largement prescrite dans de nombreuses pathologies, notamment dans la phase de consolidation et la maintenance des LAL [Pui and Evans 2006]. Ces deux phases sont très importantes pour aboutir à une rémission complète de la maladie. Une étude a montré que la sensibilité à la 6-MP chez les patients atteints de LAL-T est associée à un meilleur pronostique [Beesley et al. 2013]. Ainsi la compréhension des mécanismes moléculaires de résistance aux thiopurines pourrait améliorer la prise en charge des patients.

Le modèle cellulaire *in vitro* utilisé dans ce travail correspond à des lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCL) obtenues à partir de lymphocytes B circulants provenant de sujets sains et immortalisés *in vitro* par l'EBV.

Les LCL sont un modèle pour des études en génomique, permettant d'analyser la relation génotype-phénotype. C'est aussi un modèle très utilisé pour l'identification de biomarqueurs en

pharmacogénomique. Chaque lignée provient d'un sujet sain différent, ce qui permet de prendre en compte les différences interindividuelles en réponse aux médicaments. De plus, l'approche transcriptomique constitue une stratégie intéressante pour l'identification de voies de signalisation impliquées dans la réponse à un médicament donné.

Pour déterminer la sensibilité de chaque lignée cellulaire LCL, les cellules sont cultivées pendant 72 heures en présence du médicament d'intérêt et selon la viabilité cellulaire observée mesurée par le test MTS, elles sont classées en fonction du niveau de résistance observée au traitement [Morag et al. 2010, Stark et al. 2010]. Chaque lignée LCL va présenter une sensibilité différente au médicament, et un profil similaire de réponse est attendu pour des molécules ayant des mécanismes d'action communs [Morag et al. 2010]. A partir de ces résultats, les LCL peuvent être classées conformément à leur sensibilité par rapport à la molécule d'intérêt. Après avoir sélectionné les LCL présentant un phénotype opposé (lignées «sensibles» et «résistantes»), la comparaison des profils transcriptomiques de ces 2 groupes de lignées peut aboutir à la caractérisation des voies métaboliques et de signalisation associées à ces phénotypes extrêmes et par conséquent l'identification de nouveaux marqueurs de réponse.

A ce jour, les LCL ont été utilisées pour les médicaments anticancéreux et immunosuppresseurs, en particulier les inhibiteurs de la synthèse des purines comme la 6-MP [Fridley et al. 2011] ou le MPA [Wu et al. 2011]. Le modèle *in vitro* des LCL parait d'autant plus approprié pour étudier les effets des thiopurines que les lymphoblastes constituent leur cible pharmacologique [Huang et al. 2007, Li et al. 2008, Wu et al. 2011].

Objectifs et méthodologie

L'objectif de ce travail est d'identifier des marqueurs de résistance ou de sensibilité aux thiopurines et d'élucider les mécanismes moléculaires associés à ces marqueurs.

Un panel de 53 LCL obtenues dans le cadre d'une collaboration avec *Tel-Aviv University* (Pr David Gurwitz), a été utilisé pour réaliser les expériences. La sensibilité de ces 53 lignées a été caractérisée par le test MTS après traitement pendant 72 heures avec 2 µM de 6-MP ou 5 µM d'azathioprine. Ensuite, deux groupes de LCL ont été sélectionnés: 6 lignées «sensibles» et 5 lignées «résistantes». De plus, nous avons établi une collaboration avec l'hôpital Necker - Enfants Malades pour obtenir 6 lignées LCL provenant de patients atteints par le syndrome de Lesch-Nyhan, porteurs d'un déficit génétique en HPRT (hypoxanthine guanosine phosphotransférase), utilisées comme témoins du phénotype «résistant» en raison de l'absence de biotransformation en molécules actives (dérivés nucléotidiques) des thiopurines.

Nous avons mesuré dans les LCL les activités enzymatiques de la TPMT et de l'HPRT car elles représentent les principales enzymes du métabolisme des thiopurines. Par la suite, nous avons procédé à une analyse trancriptomique globale sur puce (Affymetrix Human Gene 2.0ST) et une

comparaison de l'expression relative de chaque gène dans les lignées «résistantes» par rapport aux lignées «sensibles» par un test *t* de Student. Une analyse fonctionnelle bioinformatique des gènes différentiellement exprimés (p<0,01) a été réalisée à l'aide des outils *Gene Ontology* (GO) et *Ingenuity Pathway Analysis*®. Une signature transcriptomique définissant les lignées résistantes a été réalisée grâce à un algorithme classant. Pour valider ces résultats, les facteurs confondants, issus de la littérature et pouvant être à l'origine d'un biais dans l'interprétation des résultats, ont été analysés: détermination du nombre de copies d'ADN mitochondrial (ADNm) et du nombre de copies de l'EBV, mesure de la concentration d'ATP intracellulaire et mesure du taux de prolifération basale des lignées [Choy et al. 2008, Stark et al. 2010].

Principaux résultats et discussion

Les résultats de ce travail montrent qu'il existe une très bonne corrélation entre l'inhibition de la prolifération après traitement par la 6-MP ou par l'azathioprine (r=0,95 ; p<0,0001), ce qui confirme un phénotype semblable avec les deux médicaments pour une même lignée. Concernant les activités enzymatiques de la TPMT et de l'HPRT, les lignées «sensibles» présentent une activité TPMT significativement inférieure (p=0,024) par rapport aux lignées «résistantes», alors que pour l'enzyme HPRT nous n'avons pas mis en évidence de différence entre les lignées «sensibles» et «résistantes». La différence observée entre les deux groupes de LCL pour l'activité TPMT est cohérente avec les données chez les patients recevant des thiopurines. En effet, les patients avec une activité TPMT diminuée (déficit partiel en TPMT) sont plus «sensibles» aux thiopurines avec la survenue plus fréquente de toxicités et un taux de rémission plus élevé par rapport aux patients ayant une TPMT normale [Lennard et al. 1990, Evans et al. 2001].

Les facteurs confondants (nombre de copies de l'ADNmt et de l'EBV, ATP intracellulaire et activité de l'HPRT) ne diffèrent pas entre les lignées «sensibles» et «résistantes». Par contre, les cellules «résistantes» ont une prolifération cellulaire basale inférieure à celles des lignées «sensibles» (p=0,052), ce qui est compatible avec une inhibition de la croissance par la 6-MP de 18 fois supérieure dans les lignées «sensibles» par rapport aux lignées «résistantes». De plus, une des hypothèses de GB Elion et G Hitchings était que l'activité de la 6-MP est corrélée à la prolifération cellulaire [Elion 1989]. Dans la mesure où les cellules leucémiques prolifèrent plus rapidement que les cellules non cancéreuses, la 6-MP ciblera plus sélectivement les cellules avec un taux de prolifération plus élevé.

L'analyse transcriptomique globale nous a permis d'aboutir, grâce à un algorithme classant, à une signature transcriptomique de 32 gènes (22 surexprimés et 10 sous-exprimés) qui a été ensuite validée gène par gène par qPCR (de l'anglais, quantitative polymerase chain reaction). Cette liste de gènes a permis de différencier les lignées «résistantes» et «sensibles». Parmi ces gènes, SLC7A5, le transporteur de glutamine, est sous-exprimé dans les cellules «résistantes» par rapport

aux cellules «sensibles», ce qui est cohérent avec le rôle important de la glutaminolyse et l'import intracellulaire de glutamine au cours de la prolifération lymphocytaire.

De plus, le gène *EGLN1*, qui code pour la protéine PHD2, se trouve surexprimé dans les lignées «résistantes» par rapport aux lignées «sensibles». Dans la littérature, il a été rapporté le lien entre une surexpression de PHD2 et une augmentation de la résistance à des chimiothérapies [Chan and Giaccia 2010]. PHD2, en présence d'oxygène et α-cétoglutarate (co-substrats) peut hydroxyler des résidus prolines. Spécifiquement, en normoxie, PHD2 hydroxyle les prolines en position 402 et 564 de la protéine HIF-1α, ce qui favorise la fixation de VHL et la reconnaissance du complexe d'ubiquitine ligase E3 pour la dégradation par le protéasome [Tanimoto et al. 2000, Semenza 2007, Shen and Jr 2013]. En situation d'hypoxie, le déficit d'oxygène inhibe l'hydroxylation de HIF-1α par PHD2 et par conséquent, la protéine HIF-1α est stabilisée. HIF-1α est un facteur de transcription, qui va réguler la transcription de gènes cibles pour permettre aux cellules de survivre à ce stress hypoxique. Parmi les gènes cibles, on note les transporteurs du glucose, GLUT1 et GLUT3 (SLC2A1 et SLC2A3), et l'enzyme PFKFB3, et d'autres enzymes ou transporteurs impliqués dans le métabolisme du glucose [Ke and Costa 2006, Majmundar et al. 2010, Semenza 2010]. HIF-1α, en plus de son rôle largement connu dans le stress hypoxique, a été décrit comme un point de contrôle dans le métabolisme énergétique cellulaire, indépendamment des conditions d'oxygène [Vander-Heiden et al. 2009, Pearce et al. 2013]. Ces résultats préliminaires sur les effets de la 6-MP sur le métabolisme cellulaire nous ont permis d'initier le projet de thèse.

Article publié dans *Genome Medicine* (cf. pages suivantes)

«Molecular insight into thiopurine resistance: transcriptomic signature in lymphoblastoid cell lines»

Chouchana L, Fernández-Ramos AA, Dumont F, Laurent-Marchetti C, Ceballos-Picot I, Beaune P, Gurwitz D, Loriot MA. *Genome Medicine*. 2015. 7(37):1-12.

Facteur d'impact: 7,07

Article 1

Les effets des molécules immunosuppressives dans la reprogrammation métabolique des cellules T

Ana A. Fernández-Ramos,[1,2] Virginie Poindessous,[1,2] Catherine Laurent-Marchetti,[1,2] Nicolas Pallet,[1,2,3] Marie-Anne Loriot[1,2,3]

[1] INSERM UMR-S 1147, Centre Universitaire des Saints-Pères, 45 rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France

[2] Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 45, rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France

[3] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Biochimie, 20 rue Leblanc 75015 Paris, France

Contexte

Dans le but de réaliser une synthèse bibliographique, j'ai rédigé durant ma thèse une revue (ci-après) regroupant les principales études publiées sur la reprogrammation métabolique aussi bien dans les cellules cancéreuses que dans les cellules T, ainsi que les conséquences attendues sur le métabolisme énergétique cellulaire en cas de traitement par des médicaments immunosuppresseurs en fonction de leurs cibles pharmacologiques ou des voies de signalisation régulées par ces molécules.

La reprogrammation métabolique permet aux cellules avec un taux de prolifération élevé de croître et de proliférer. D'une part, elles vont passer d'une dégradation du glucose *via* le cycle de Krebs et l'OXPHOS vers la glycolyse aérobie, c'est-à-dire, la production de lactate à partir du pyruvate. D'autre part, il existe une augmentation concomitante de la glutaminolyse et de la synthèse de nucléotides et de lipides. Ces modifications métaboliques aboutissent à une production d'ATP plus rapide mais moins efficace et surtout à une accumulation des intermédiaires pour la synthèse de protéines, nucléotides et lipides indispensables à la croissance cellulaire.

Certaines molécules ont déjà été décrites comme régulateurs clé du métabolisme, et sont désignées comme «checkpoints» métaboliques. Parmi elles, AMPK, mTOR, HIF-1α et Myc sont des acteurs majeurs dans la régulation du métabolisme énergétique à la fois dans les cellules tumorales et les lymphocytes T. Ces «checkpoints» métaboliques constituent dans certains cas la cible pharmacologique de médicaments. C'est le cas notamment de la rapamycine,

immunosuppresseur développé comme inhibiteur de mTOR et pour laquelle plusieurs études ont mis en évidence ses effets dans le métabolisme énergétique des cellules T et cancéreuses. Dans d'autres cas il peut s'agir de médicaments inhibant des voies métaboliques essentielles à la prolifération comme la synthèse des purines, et qui sont de ce fait susceptibles d'influencer la reprogrammation métabolique plus ou moins directement.

Dans cette analyse bibliographique nous nous sommes attachés à recenser les études pouvant permettre de faire un lien entre le mécanisme d'action des médicaments immunosuppresseurs et la reprogrammation métabolique sur la base, soit de leur impact connu sur des voies métaboliques, soit de leur effet sur les «checkpoints» métaboliques. Nous avons ensuite discuté l'hypothèse que les médicaments immunosuppresseurs classiques, qui comprennent la rapamycine, le tacrolimus, la ciclosporine, la 6-MP, le MPA et le MTX, largement utilisés en clinique dans plusieurs pathologies (principalement dans les maladies auto-immunes, inflammatoires et en transplantation) et qui bloquent la prolifération lymphocytaire, induisant potentiellement des perturbations métaboliques à l'origine de leur action anti-prolifération ou d'effets indésirables.

Revue publié dans *Biochimie* (cf. pages suivantes)

"The effect of immunosuppressive molecules on T-cell metabolic reprogramming"

Fernández-Ramos AA, Poindessous V, Laurent-Marchetti C, Pallet N, Loriot MA. *Biochimie*. 2016; 127: 23-36.

Impact factor: 3,11

Article 2

La 6-mercaptopurine induit un stress énergétique dans les cellules T en prolifération

Ana A. Fernández-Ramos,[1,2] Catherine Laurent-Marchetti,[1,2] Virginie Poindessous,[1,2] Samantha Antonio,[2,3] Pierre Laurent-Puig,[1,2,4] Sylvie Bortoli,[2,3] Marie-Anne Loriot,[1,2,4*] Nicolas Pallet[1,2,4*]

[1] INSERM UMR-S 1147, Centre Universitaire des Saints-Pères, 45 rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France

[2] Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 45, rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France

[3] INSERM UMR-S 1124, 45 rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France

[4] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Biochimie, 20 rue Leblanc 75015 Paris, France

* Seniors co-auteurs.

Contexte

La 6-MP appartient à la classe thérapeutique des thiopurines, molécules ayant des effets antiprolifératifs par inhibition de la synthèse *de novo* des purines, car leurs métabolites vont interférer avec la synthèse d'ADN, d'ARN et des protéines, en induisant l'apoptose. La 6-MP est un médicament largement utilisé en clinique dans plusieurs pathologies comme dans les MICI, les maladies auto-immunes, après transplantation d'organes solides ou en cancérologie, notamment dans les LAL chez l'enfant. Cependant, ses effets sur le métabolisme cellulaire restent partiellement connus [Allison 2000, Halloran 2004, Chouchana et al. 2012, Zerra et al. 2016].

Des travaux antérieurs ont permis de mieux comprendre les effets cytotoxiques (*via* l'inhibition de Rac1) et antiprolifératifs (par inhibition de la synthèse des purines) de la 6-MP [Allison 2000, Chouchana et al. 2012]. Plus récemment, dans différents modèles cellulaires il a été démontré que la 6-MP inhibe la voie de signalisation PI3K/mTOR [Huang et al. 2016], qu'elle modifie l'activité transcriptionnelle de HIF-1α [Yoo et al. 2007] et influence également son activité dans la régulation des facteurs de transcription de la famille NR4A [Ordentlich et al. 2003]. Enfin, la 6-MP inhibe l'activité d'enzymes impliquées dans la glycolyse, comme l'HK et la PFK2 [Rodríguez-Enríquez et al. 2009]. L'ensemble de ces données suggère que la 6-MP en induisant la déviation de l'OXPHOS vers la glycolyse aérobie pourrait ainsi influencer la reprogrammation métabolique [Fernández-Ramos et al. 2016].

En effet, la reprogrammation métabolique favorise la glycolyse aérobie, la glutaminolyse et la synthèse de lipides et nucléotides pour promouvoir la croissance et la prolifération cellulaire, mécanisme bien connu aujourd'hui pour les cellules cancéreuses. La réorientation du métabolisme est moins efficiente au niveau énergétique (en terme de production d'ATP) mais permet de générer des intermédiaires du métabolisme indispensables pour répondre aux besoins de la cellule. Dans ce contexte, AMPK, mTOR, HIF-1α et Myc, notamment, sont décrits comme des points de contrôle ou «checkpoints» métaboliques [Warburg 1956, Phan et al. 2014, Fernández-Ramos et al. 2016].

Objectifs et méthodologie

Ce travail de recherche a pour objectif l'étude des effets métaboliques de la 6-MP dans un modèle de lignée cellulaire leucémique.

Nous avons utilisé la lignée Jurkat, provenant du sang périphérique d'un patient âgé de 14 ans atteint d'une LAL de cellules T. Cette lignée a été fournie par l'*American Type Culture Collection* (ATCC) en Novembre 2014.

Nous avons tout d'abord déterminé la dose de 6-MP pour les expériences ultérieures. Nous avons caractérisé la réponse de la lignée Jurkat au traitement par la 6-MP en mesurant la viabilité cellulaire à différentes concentrations, ainsi que le pourcentage de cellules apoptotiques et la prolifération cellulaire (résultats non montrés). Cela nous a permis d'établir la dose optimale à 50 µM permettant d'observer l'effet anti-prolifératif de la 6-MP en limitant sa cytotoxicité, cette dose étant également retrouvée dans la littérature [Ordentlich et al. 2003, Yoo et al. 2007, Huang et al. 2016].

Par la suite, nous avons vérifié que la 6-MP induisait une carence en AMP, ADP et ATP. Nous avons aussi réalisé des expériences de Western blot et qPCR et le dosage du lactate extracellulaire. Enfin, en collaboration avec Dr. Sylvie Bortoli et Samantha Antonio (INSERM UMR-S 1124, Centre Universitaire des Saints-Pères), nous avons mesuré le flux glycolytique et glutaminolytique, ainsi que l'entrée du glucose (*glucose uptake*) en incubant les cellules Jurkat avec du glucose et de la glutamine radiomarqués en présence ou non de la 6-MP.

Principaux résultats et discussion

Nous avons montré pour la première fois les effets de la 6-MP sur le métabolisme cellulaire des cellules T en prolifération, plus spécifiquement dans un modèle de LAL, la lignée humaine Jurkat.

Nos résultats montrent que la 6-MP diminue très précocement et de façon prolongée la production d'ATP, avec une décroissance maximale après 48 heures d'incubation avec la 6-MP (**Figure 2**). Nous observons une baisse simultanée d'ADP et d'AMP corrélée à une augmentation

des rapports ADP/ATP et AMP/ATP, à l'origine de l'activation par phosphorylation de l'AMPK. Le contrôle positif de l'activation d'AMPK, AICAR (aminoimidazole carboxamide ribonucleotide ou ZMP), est aussi activé significativement après 48 heures d'incubation.

L'analyse transcriptomique (**Figure 3**) des gènes impliqués dans la glycolyse et la glutaminolyse a montré une surexpression significative au cours du temps de GPI (glucose-6-phosphate isomérase), HK2, PFKFB3, SLC2A3, ENO1, LDHA, SLC1A5, SLC38A1 (solute carrier family 38 member 1), SLC3A2 (solute carrier family 3 member 2) et GLUD1 (glutamate déshydrogénase). En revanche, SLC2A1, TPI et LDHB sont significativement sous exprimés. De plus, les gènes impliqués sur la synthèse des purines et pyrimidines sont significativement sous exprimés (à l'exception de la G6PD).

Le profil transcriptomique observé après carence énergétique, à partir des cellules cultivées sans glucose, sans glutamine et sans sérum, est similaire à celui obtenu après incubation avec la 6-MP mais avec une intensité moins importante. Plus spécifiquement, GPI, SLC2A3, ENO1, LDHA, GLUD1 et tous les transcrits analysés issus de la synthèse des purines et pyrimidines présentent la même tendance. Cela renforce l'hypothèse que la 6-MP induit un stress énergétique dans des cellules en prolifération.

Les «checkpoints» métaboliques, régulateurs de la reprogrammation métabolique, incluant HIF-1α, Myc et phospho-p70s6k (reflétant l'activité de mTOR) ont été analysés par Western blot (**Figure 4**). Nous avons observé une inhibition significative de HIF-1α, Myc et phospho-p70s6k et maintenue au cours du temps.

Les analyses fonctionnelles mesurant l'oxydation du glucose et de la glutamine radio-marqués montrent une baisse significative du flux glycolytique et glutaminolytique après 48 heures d'exposition à la 6-MP, suggérant que la 6-MP inhibe la dégradation du glucose par le cycle de Krebs et l'OXPHOS. En mesurant la quantité de lactate extracellulaire, qui reflète la glycolyse aérobie (effet Warburg), nous avons observé une diminution par rapport au contrôle, révélant que la 6-MP inhibe aussi la glycolyse aérobie.

Finalement, nous avons montré que la 6-MP ne modifie ni l'entrée du glucose dans la cellule ni l'expression des transporteurs du glucose GLUT1 et GLUT3 (**Figure 5**).

En conclusion, notre travail a permis de caractériser l'impact de la 6-MP sur le métabolisme de cellules T prolifératives. Nos résultats conduisent à proposer l'hypothèse que la 6-MP, par diminution précoce et prolongée du pool intracellulaire d'ATP, *via* l'inhibition de la synthèse *de novo* des purines, active le senseur métabolique AMPK, et par conséquence inhibe mTORC1. L'inhibition de mTORC1 par la 6-MP va être à l'origine de la diminution de l'expression de HIF-1α et de Myc et du ralentissement de l'oxydation du glucose et de la glutamine, qui pourrait également être en lien avec la diminution de l'ATP et de la phosphorylation des enzymes de la glycolyse et de la glutaminolyse.

Article publié dans *Oncotarget* (cf. pages suivantes)

«6-mercaptopurine promotes energetic failure in proliferating T cells»

Fernández-Ramos AA, Marchetti-Laurent C, Poindessous V, Antonio S, Laurent-Puig P, Bortoli S, Loriot MA, Pallet N. *Oncotarget.* 2017. 8(26):43048-43060. DOI: 10.18632/oncotarget.17889

Facteur d'impact: 5,17

Article 3

Caractérisation de l'impact de l'acide mycophénolique sur le métabolisme des cellules T Jurkat

Ana A. Fernández-Ramos,[1,2] Catherine Marchetti-Laurent,[1,2] Virginie Poindessous,[1,2] Samantha Antonio,[2,3] Céline Petitgas,[2,5] Irène Ceballos-Picot,[2,5] Pierre Laurent-Puig,[1,2,4] Sylvie Bortoli,[2,3] Marie-Anne Loriot,[1,2,4‡] Nicolas Pallet[1,2,4‡]

[1] INSERM UMR-S 1147, Centre Universitaire des Saints-Pères, 45 rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France

[2] Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité. 45, rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France

[3] INSERM UMR-S 1124, 45 rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France

[4] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Biochimie, 20 rue Leblanc 75015 Paris, France

[5] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker-Enfants Malades, Laboratoire de Biochimie métabolomique et protéomique, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris, France

* Seniors co-auteurs.

Contexte

La connaissance de la relation entre le métabolisme des cellules du système immunitaire (désigné sous le terme d'«immunométabolisme») et l'activation, la prolifération et la polarisation lymphocytaire a beaucoup progressé. Le métabolisme des lymphocytes T est très dynamique et sa plasticité permet à la fois l'adaptabilité de ces cellules aux signaux environnementaux et la différenciation nécessaire pour leurs fonctions effectrices et mémoire. Après stimulation antigénique, une réorientation métabolique va s'opérer vers la glycolyse aérobie (transformation du glucose en pyruvate puis en lactate, nommé effet Warburg) et la glutaminolyse (transformation de la glutamine en α-cétoglutarate) ainsi que la production des précurseurs de la synthèse des nucléotides puriques et pyrimidiques, des lipides et des acides aminés par les voies des pentoses phosphates et de la sérine pour soutenir la croissance et la prolifération rapide des lymphocytes T [Quéméneur et al. 2003, Pearce et al. 2013].

La reprogrammation métabolique est sous le contrôle de senseurs moléculaires qui intègrent les signaux d'activation extracellulaires en provenance du microenvironnement et le statut énergétique intracellulaire. Ces «checkpoints» métaboliques comprennent principalement Akt,

mTORC1, AMPK, Myc et HIF-1α, qui sont les médiateurs des signaux extra- et intracellulaires pour permettre la modification du métabolisme mais aussi la différenciation des différents sous-types lymphocytaires [Macintyre and Rathmell 2013, MacIver et al. 2013].

Des données indirectes suggèrent que les immunosuppresseurs ciblant des voies de signalisation importantes pour l'activation et la prolifération des lymphocytes T peuvent également moduler l'activité des «checkpoints» métaboliques et, par conséquent, le métabolisme lymphocytaire [Allison 2000, Halloran 2004, Wiseman 2016]. Ainsi, l'inhibition de mTORC1 par la rapamycine induit l'état d'immunosuppression qui s'accompagne d'une modification du métabolisme. En plus du rôle crucial de mTORC1 dans la régulation de la reprogrammation métabolique des cellules immunitaires, des données récentes suggèrent que les médicaments modulant la synthèse des purines affectent aussi certains «checkpoints» métaboliques et pourraient ainsi influencer le métabolisme cellulaire. Spécifiquement, le MPA, qui inhibe réversiblement l'IMPDH de type II, une enzyme limitante de la synthèse *de novo* des purines, peut avoir un effet sur le métabolisme cellulaire en diminuant le pool de guanosine et la synthèse d'ADN. De plus, le MPA inhibe sélectivement la prolifération des lymphocytes car ces cellules sont très dépendantes de la voie de synthèse *de novo* des purines en l'absence de la voie de sauvetage [Halloran 2004, Taylor et al. 2005, Wiseman 2016]. Bien que des travaux antérieurs ont pu montrer les effets du MPA sur HIF-1α, Myc et mTOR [Domhan et al. 2008, Dun et al. 2014], l'analyse détaillée des effets du MPA sur le métabolisme lymphocytaire n'a pas fait l'objet de publications.

Objectifs et méthodologie

Ce travail de recherche a eu pour objectif l'étude des effets métaboliques du MPA et de la rapamycine dans un modèle de lymphocytes humains en prolifération. Nous avons utilisé la lignée cellulaire Jurkat, provenant de sang périphérique d'un patient âgé de 14 ans atteint d'une LAL de cellules T. Cette lignée a été fournie par l'ATCC.

Tout d'abord, nous avons caractérisé la réponse de la lignée Jurkat au traitement par le MPA en mesurant la viabilité cellulaire, la prolifération cellulaire, le pourcentage de cellules apoptotiques et la progression du cycle cellulaire. Nous avons établi à 0,5 µM la concentration de travail du MPA permettant le blocage de la prolifération en l'absence d'effet cytotoxique.

Par la suite, nous avons réalisé des expériences de Western blot et de qPCR pour mesurer l'expression des gènes d'intérêt et évaluer les variations des protéines cibles ou leur état d'activation. Nous avons déterminé les concentrations d'ATP et du lactate extracellulaire à l'aide des kits commerciaux. Grâce à une collaboration avec le Dr. Irène Ceballos-Picot et Céline Petitgas (Laboratoire de Biochimie métabolomique et protéomique, Hôpital Necker Enfants-Malades, Paris 15ème) nous avons détecté et quantifié différents métabolites des purines et pyrimidines par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). En collaboration avec le Dr. Sylvie

Bortoli et Samantha Antonio (INSERM UMRS 1124, Centre Universitaire des Saints-Pères), nous avons mesuré le flux glycolytique et glutaminolytique, ainsi que la captation du glucose (*glucose uptake*) en incubant les cellules Jurkat avec des molécules de glucose et de glutamine radiomarquées, en présence ou non du MPA et de la rapamycine.

Principaux résultats et discussion

Pour la première fois, nous avons montré les modifications du métabolisme induites par le traitement par le MPA dans un modèle *in vitro* de lymphocytes T qui prolifèrent en comparaison avec la rapamycine.

L'analyse transcriptomique des gènes impliqués dans la glycolyse, la glutaminolyse et la synthèse de nucléotides montre que le MPA provoque une augmentation généralisée de l'expression de l'ensemble des gènes analysés, tandis que la rapamycine induit une diminution globale sauf pour GPI, SLC2A3 et ENO1 (**Figure 2**).

Ensuite, nous avons étudié par Western blot les effets du MPA et de la rapamycine sur les «checkpoints» métaboliques (**Figure 3**). Le MPA réduit l'expression de HIF-1α et Myc sans altérer ni mTOR (évalué par la phosphorylation de p70s6k) ni Akt, suggérant que le MPA modifie l'expression de HIF-1α et Myc indépendamment de la voie de signalisation de mTOR et Akt. Par contre, la rapamycine, inhibiteur connu de mTOR, inhibe également l'expression et l'activation d'Akt, HIF-1α et Myc.

Nos résultats montrent aussi que le MPA diminue le pool intracellulaire d'ATP de façon transitoire et précoce, tandis que la rapamycine entraîne une diminution progressive de l'ATP qui devient significative seulement après 48 heures (**Figure 4**). Par la suite, nous avons analysé l'activité d'AMPK, un senseur du stress énergétique. De manière cohérente avec la diminution d'ATP, le MPA active l'AMPK après 16 heures de traitement tandis que la rapamycine l'active après 16 et 48 heures.

De plus, nous avons réalisé des analyses fonctionnelles en mesurant l'oxydation du glucose et de la glutamine radio-marqués (**Figure 5**). Le MPA et la rapamycine diminuent l'oxydation du glucose et de la glutamine après 48 heures d'exposition, suggérant que ces deux médicaments inhibent la voie de dégradation du glucose par le cycle de Krebs et l'OXPHOS. De plus, nous avons mesuré la production de lactate extracellulaire, qui reflète la glycolyse aérobie (effet Warburg). Ni le MPA ni la rapamycine ne modifient la quantité de lactate extracellulaire, suggérant qu'ils n'inhibent pas la glycolyse aérobie. Finalement, nous avons montré que le MPA et la rapamycine diminuent la captation du glucose dont le mécanisme reste à clarifier puisque l'expression des transporteurs du glucose GLUT1 et GLUT3 n'est pas modifiée.

Nous avons montré les effets des médicaments antiprolifératifs MPA (et rapamycine) sur les voies métaboliques des lymphocytes T en prolifération. Nos résultats démontrent que le MPA influence fortement le statut énergétique de la cellule, en particulier en modifiant la glycolyse et la glutaminolyse par inhibition des «checkpoints» métaboliques HIF-1α et Myc. Ces altérations métaboliques induites par le MPA pourraient contribuer à l'action antiproliférative de ce médicament. Le mécanisme expliquant l'effet du MPA sur la reprogrammation métabolique ainsi que la cinétique des évènements moléculaires aboutissant à la réduction du métabolisme restent à élucider. Cependant, on peut noter que les effets du MPA ne sont pas spécifiquement liés à une diminution de la prolifération puisque la rapamycine, qui inhibe également la prolifération cellulaire par son action inhibitrice de mTOR, entraîne des modifications du métabolisme différentes de celles du MPA.

En conclusion, nos travaux suggèrent que l'activité immunosuppressive du MPA ou certains de ses effets secondaires pourraient être au moins en partie liés aux modifications induites dans le métabolisme énergétique des lymphocytes T.

Article accepté dans *Scientific Reports* (cf. pages suivantes)

«A comprehensive characterization of the impact of mycophenolic acid on the metabolism of Jurkat T cells»

Fernández-Ramos AA, Marchetti-Laurent C, Poindessous V, Antonio S, Céline Petitgas, Irène Ceballos-Picot, Laurent-Puig P, Bortoli S, Loriot MA, Pallet N. Accepted.

Facteur d'impact: 4,25

DISCUSSION

La reprogrammation métabolique est une caractéristique des cellules cancéreuses correspondant à une réorientation de la phosphorylation oxydative vers la glycolyse aérobie pour rediriger les sources de carbone vers les voies de biosynthèse produisant des acides nucléiques, des lipides et des protéines, favorisant ainsi la prolifération et la survie cellulaire. La glycolyse aérobie et la glutaminolyse constituent les deux voies majeures positivement régulées dans les cellules cancéreuses pour assurer leur division rapide. Ce processus initialement décrit dès 1920 par Otto Warburg sous le terme d'effet Warburg s'effectue sous l'influence de facteurs tels que l'hypoxie, les mutations oncogéniques, la carence en nutriments, et permet une adaptation efficace et rapide des tumeurs à leur microenvironnement. Il est plus récemment apparu que ce mécanisme adaptatif pouvait également concerner des cellules saines et en particulier les cellules du système immunitaire qui, sous l'effet de signaux d'activation ou de stimulation antigénique, doivent rapidement proliférer, qu'il s'agisse d'infiltrats lymphocytaires péri-tumoraux ou de cellules recrutées sur des sites infectieux ou inflammatoires. Ainsi, le profil métabolique des cellules tumorales et des lymphocytes activés s'est avéré relativement similaire, posant la question de l'influence des stratégies thérapeutiques impliquant la modulation pharmacologique de la reprogrammation métabolique à la fois sur le développement tumoral et sur le fonctionnement du système immunitaire.

Par ailleurs la reprogrammation métabolique joue un rôle crucial non seulement dans l'activation mais aussi dans la différenciation et les fonctions effectrices ou mémoire des lymphocytes. Les lymphocytes T constituent la cible pharmacologique des médicaments immunosuppresseurs et antiprolifératifs dans des situations pathologiques variées incluant les maladies auto-immunes et inflammatoires, la transplantation ou encore en cancérologie dans le traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques. Parmi les médicaments concernés il est connu que certains, dont la rapamycine développée comme inhibiteur de mTOR, sont capables de moduler l'activité des senseurs moléculaires identifiés comme des acteurs clés dans le processus de reprogrammation métabolique. D'autres comme la 6-MP ou le MPA sont des inhibiteurs de la de biosynthèse des nucléotides et n'étaient pas connus pour moduler le métabolisme énergétique lymphocytaire.

Dans ce contexte nous avons fait l'hypothèse que la modulation de la reprogrammation métabolique dans les lymphocytes pouvait participer au mécanisme d'action des médicaments immunosuppresseurs à propriétés antiprolifératives. Durant ma thèse, mes travaux de recherche ont eu pour objectif l'analyse de l'impact de trois médicaments incluant la 6-MP, le MPA et la rapamycine, sur le métabolisme lymphocytaire afin de caractériser leur influence sur les voies majeures de la reprogrammation métabolique, en particulier la glycolyse et la glutaminolyse, ainsi que sur les senseurs moléculaires («metabolic checkpoints» en anglais) de ce processus.

I. Modèle cellulaire: la lignée Jurkat, intérêts et limites

Pour réaliser ce travail de thèse, nous avons utilisé un modèle *in vitro* de lignée cellulaire humaine Jurkat. Ce modèle provient du sang périphérique d'un patient de 14 ans atteint d'une leucémie aiguë lymphoblastique de cellules T. La lignée cellulaire Jurkat a été largement utilisée pour la caractérisation des lymphocytes T [Abraham 2000, Astoul et al. 2001, Abraham 2004]. Les premiers clones de Jurkat étaient contaminés par des mycoplasmes et c'est le clone E6-1 (non contaminé) qui a été largement utilisé par les immunologistes. Les études par mutagénèse sur la lignée Jurkat ont permis notamment d'élucider la structure des récepteurs TCR et CD28 et de décrypter la transduction de signaux d'activation lymphocytaire [Abraham 2000, Greene 2003, Bartelt et al. 2009]. Cette lignée cellulaire permet d'obtenir des données illimitées, elle est manipulable génétiquement, facilement accessible, peu coûteuse, simple à cultiver et peut être congelée à long terme garantissant la reproductibilité du modèle au cours des expériences. De plus, l'accès à une lignée permet de s'affranchir d'une grande variabilité interindividuelle à l'origine d'un manque de reproductibilité et qui peut donc constituer un frein à la validation de preuves de concept. Pour toutes ces raisons, le choix d'une lignée cellulaire semble être l'option de choix pour démarrer un projet (comme dans notre cas) et tester différentes hypothèses avant d'envisager des études plus lourdes et plus coûteuses sur des cellules lymphocytaires en culture primaire.

Les cellules Jurkat sont déficientes pour les voies PTEN et SHIP (SH2-domain-containing inositol polyphosphate 5'phosphatase). L'absence d'expression de la protéine PTEN, qui a été également mise en évidence dans d'autres lignées cellulaires leucémiques comme MOLT-4, conduit à une activation constitutive de PI3K, et par conséquent de ses effecteurs comme Akt [Abraham 2000, Astoul et al. 2001]. La comparaison des résultats issus de la lignée cellulaire Jurkat et de la culture primaire de lymphocytes T permet de conclure que la lignée Jurkat est un modèle pertinent pour l'étude du métabolisme cellulaire. Le modèle Jurkat est en effet une lignée de référence pour les recherches en immunologie, en cancérologie, en biochimie, et tout particulièrement sur le métabolisme cellulaire [Lin et al. 2003, Falk et al. 2004, Diaz et al. 2005, Hulleman et al. 2009, Tomm et al. 2013, Ledderose et al. 2014, Zhong et al. 2016].

La première étape du projet a consisté à caractériser le modèle par rapport aux conditions de culture, au temps de doublement, et à optimiser les concentrations de médicaments à utiliser pour bloquer la prolifération en limitant la cytotoxicité. Dans un premier temps, à la suite d'un travail de thèse précédent réalisé dans le laboratoire, nous nous sommes focalisés sur la voie PHD2/HIF. À partir des données de la littérature et des résultats préliminaires obtenus nous avons ensuite élaboré mon projet de thèse en élargissant nos recherches à l'étude de la 6-MP, du MPA et de la rapamycine sur la reprogrammation métabolique dans la lignée de lymphocytes T Jurkat.

Nous avons donc choisi de travailler avec la lignée Jurkat car il s'agit d'un modèle de cellules leucémiques présentant des altérations génétiques et qui prolifèrent sans arrêt. Dans ce contexte,

leur utilisation pour l'étude des effets de la 6-MP dans la LAL semble appropriée. Cependant, la validation des effets de la 6-MP dans une deuxième lignée cellulaire leucémique, par exemple MOLT-4, provenant d'un patient âgé de 19 ans et atteint d'une LAL, serait intéressante afin de confirmer nos résultats et conforter la robustesse de nos conclusions. Par ailleurs, dans la lignée Jurkat (également dans la lignée MOLT-4), il existe une activation constitutive de la voie PI3K/Akt par perte de PTEN, et cela peut constituer également une limite pour l'extrapolation des résultats dans le contexte des lymphocytes T normaux. Il est évident que nos résultats concernant les effets de la 6-MP sur le métabolisme énergétique ne peuvent être interprétés que dans le cadre de notre modèle et que d'autres modèles plus physiologiques seront nécessaires pour les valider définitivement. Dans les lymphocytes T il existe cependant des situations physiologiques au cours desquelles la voie Akt est activée pour permettre l'expansion clonale, la différenciation, la survie des lymphocytes T effecteurs et la suppression des lymphocytes T régulateurs. Ainsi, en raison des similitudes entre le modèle Jurkat et les lymphocytes T activés, nous pouvons émettre l'hypothèse de la validité de nos résultats avec la 6-MP dans un modèle de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC, de l'anglais, peripheral blood mononuclear cells) [So and Croft 2013].

En ce qui concerne les effets du MPA et de la rapamycine, nous avons réalisé une analyse exploratoire pour évaluer les effets de ces immunosuppresseurs antiprolifératifs sur le métabolisme énergétique dans la lignée Jurkat. Ce modèle *in vitro* nous a permis d'évaluer les effets de ces médicaments sur le métabolisme lymphocytaire et d'identifier des cibles cellulaires ayant un potentiel thérapeutique. La confirmation de nos résultats dans un modèle animal *in vivo* ou chez l'Homme (sujets sains ou patients traités) *ex-vivo* à partir des PBMC sera l'étape suivante nécessaire pour l'extrapolation dans un contexte clinique ou le transfert de ces connaissances pour d'éventuelles applications thérapeutiques.

Il est important de souligner que la lignée Jurkat ne semble pas appropriée pour l'étude des inhibiteurs de la calcineurine, comme la ciclosporine ou le tacrolimus car ces médicaments bloquent le signal 1 d'activation lymphocytaire, mais sans inhiber la prolifération. En effet, nous avons réalisé des expériences avec le tacrolimus (*données non publiées*) et nous n'avons observé aucune variation dans l'expression des gènes des différentes voies métaboliques étudiées, ainsi qu'au niveau des «checkpoints» métaboliques et dans les flux glycolytique ou glutaminolytique. Afin de s'assurer que ces résultats n'étaient pas obtenus du fait de l'absence de captation du tacrolimus, nous avons dosé le tacrolimus intracellulaire (Hôpital Européen Georges Pompidou, service de Pharmacologie) par chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse (LC-MS, de l'anglais liquid chromatography-mass spectrometry). Nous avons ainsi pu quantifier le tacrolimus, suggérant que l'absence d'effets sur le métabolisme pourrait être due à l'inadéquation du modèle, puisque d'autres études dans des cultures primaires d'hépatocytes humains ainsi que dans des lignées cancéreuses ou des myoblastes ont rapporté les effets du tacrolimus sur les «checkpoints» métaboliques [Radu et al. 2004, Basu et al. 2011, Illsinger et al. 2011a, Basu et al. 2012, Pereira et al. 2014]. L'étude des effets du tacrolimus sur la reprogrammation métabolique

nécessitera une autre lignée sensible à ce médicament ou un modèle de culture primaire de PBMC.

II. Analyse comparative des résultats

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes focalisés sur l'étude *in vitro* des effets de la 6-MP, du MPA et de la rapamycine sur le métabolisme énergétique lymphocytaire dans la lignée leucémique Jurkat. Les principaux résultats sont rassemblés dans le **tableau 7**.

Globalement, nous observons des effets similaires entre les trois médicaments pour les voies métaboliques étudiées. Dans les expériences fonctionnelles, nous avons mesuré la captation du glucose, sa vitesse d'oxydation et la production de lactate extracellulaire ainsi que l'oxydation de la glutamine. Les 3 médicaments étudiés diminuent le métabolisme oxydatif du glucose et de la glutamine. Pour le MPA et la rapamycine, la diminution de l'oxydation du glucose peut être expliquée par une diminution de sa captation mais sans altération de la production du lactate extracellulaire. Seule la 6-MP entraîne une diminution du lactate extracellulaire en l'absence de modification de la captation du glucose, suggérant que le glucose n'est pas consommé dans la glycolyse, mais pourrait être redirigé vers d'autres voies métaboliques par suppléer les besoins en ATP indispensable à l'activation des enzymes de la glycolyse. La diminution de l'entrée du glucose dans le milieu intracellulaire n'est pas expliquée par une modification de l'expression des transporteurs GLUT1 et GLUT3. Or, la localisation subcellulaire des transporteurs est également importante, puisque dans les lymphocytes T activés, on observe une augmentation de la localisation membranaire des transporteurs du glucose par comparaison avec les lymphocytes T naïfs. Dans le cas du MPA et de la rapamycine, il faudrait caractériser l'impact des médicaments sur la localisation cellulaire des transporteurs GLUT dans notre modèle pour compléter cette analyse.

On peut toutefois remarquer que les différences dans le métabolisme glycolytique et glutaminolytique ne sont pas très marquées sur le plan quantitatif. Le retentissement des différents effets sur le métabolisme lymphocytaire reste à évaluer en analysant d'autres voies (ex. transport des acides aminés, oxydation des acides gras, voie des pentoses phosphates) ou facteurs de régulation (ex. p53) importants. A titre d'exemple, le facteur de transcription et suppresseur de tumeurs p53 a été décrit comme un régulateur de la glycolyse et l'OXPHOS, en diminuant le flux glycolytique par régulation de HK2, de l'expression des transporteurs du glucose GLUT1 et GLUT4 et de la glutaminase 2, principalement [Soga 2013, Phan et al. 2014].

		6-MP	MPA	Rapa
Expériences fonctionnelles	Oxydation du glucose	↓	↓	↓
	Oxydation de la glutamine	↓	↓	↓
	Lactate extracellulaire	↓	=	=
	Captation du glucose	=	↓	↓
Transporteurs du glucose	GLUT1	=	=	=
	GLUT3	=	=	=
Analyse de l'expression de gènes	Glycolyse	↑ globale	↑ globale	↑/↓
	Glutaminolyse	↑ globale	↑ globale	↓ globale
	Synthèse de nucléotides	↓ globale	↑ globale	↓ globale
«Checkpoints» métaboliques	Akt activée	=	=	↓
	P70s6k activée (voie mTOR)	↓	=	↓
	HIF-1α	↓	↓	↓
	Myc	↓	↓	↓ à 24h, = à 48h
	AMPK activée	↑	↑	↑
État énergétique	ATP	↓	↓ précoce, puis =	↓ à 48h
	ADP/ATP	↑	NA	NA
	AMP/ATP	↑	NA	NA

Tableau 7. Synthèse des résultats de la 6-MP, du MPA et de la rapamycine dans la lignée lymphocytaire T Jurkat.

Les expériences sont regroupées par type d'analyse: expériences fonctionnelles, expression des transporteurs du glucose, analyse transcriptomique ciblée de l'expression des gènes, expression des «checkpoints» métaboliques et état énergétique. La flèche «↑» signifie une augmentation avec le traitement, la «↓» une diminution, le symbole «=» pas de différence et NA, non analysé. 6-MP: 6-mercaptopurine; ADP: adénosine diphosphate; Akt: protéine kinase; AMP: adénosine monophosphate; AMPK: protéine kinase activée par AMP; ATP: adénosine triphosphate; GLUT1: transporteur du glucose 1; GLUT3: transporteur du glucose 3; HIF-1α: facteur inductible par l'hypoxie 1 α; MPA: acide mycophénolique; mTOR: cible de la rapamycine chez les mammifères; P70s6k: ribosomal s6 kinase; Rapa: rapamycine.

Au niveau transcriptionnel, nous avons analysé par qPCR plusieurs gènes impliqués dans la glycolyse, la glutaminolyse et la synthèse de nucléotides. Pour les trois médicaments, nous observons un profil différent. Il y a une surexpression globale de la plupart des gènes de la glycolyse par la 6-MP et le MPA alors que la rapamycine a un profil variable selon les gènes. Le profil d'expression des gènes de la glutaminolyse est similaire pour la 6-MP et le MPA (surexpression) mais opposé à celui observé pour la rapamycine (sous-expression). Enfin, pour les gènes de la synthèse des nucléotides, la 6-MP et la rapamycine partagent le même profil (sous-expression) tandis que le MPA présente un profil opposé (surexpression). Cela suggère que les médicaments régulent d'autres facteurs de transcription non identifiés dans ce travail et impliqués également dans l'expression de gènes du métabolisme.

En effet nous avons mis en évidence que la 6-MP, le MPA et la rapamycine inhibent de façon similaire les «checkpoints» métaboliques HIF-1α et Myc alors qu'en ce qui concerne mTOR et Akt, les 3 médicaments présentent des différences. La 6-MP et la rapamycine inhibent mTOR, tandis que le MPA n'a pas d'effet sur mTOR. La protéine Akt, un activateur de mTOR, n'est pas modulée ni par la 6-MP ni par le MPA, alors que la rapamycine l'inhibe. Il semble donc que les 3 médicaments aboutissent à une inhibition des facteurs de transcription Myc et HIF-1α mais par des mécanismes différents.

Le «checkpoint» métabolique AMPK, senseur du stress énergétique, est activé avec les 3 médicaments. Ce résultat est corrélé avec ceux obtenus sur l'état énergétique après traitement, mesuré par la concentration d'ATP intracellulaire. Le traitement par la 6-MP induit une diminution rapide d'ATP, très marquée et prolongée au cours du temps (entre 2h et 72h), s'accompagnant d'une augmentation des ratios ADP/ATP et AMP/ATP. Par contre, le MPA diminue l'ATP d'une façon précoce mais transitoire (entre 2h et 16h) tandis que l'inhibition de l'ATP intracellulaire par la rapamycine ne survient qu'après 48 heures de traitement. Ces différences montrent que, même si au niveau fonctionnel les trois médicaments agissent d'une façon similaire, sur le plan énergétique les différences sont plus marquées. En particulier pour la 6-MP qui entraîne la carence en ATP la plus importante, nous faisons l'hypothèse que d'autres voies (dégradation des acides gras par exemple) favorisant la synthèse d'ATP sont également altérées.

En regroupant les résultats des expériences fonctionnelles et de l'expression des «checkpoints» métaboliques, nous pouvons faire des hypothèses pour justifier l'impact des médicaments sur le métabolisme. Nous avons montré que la 6-MP, le MPA et la rapamycine inhibent HIF-1α et Myc. Myc est connu comme un activateur de la glycolyse et de la glutaminolyse, ce qui est cohérent avec l'inhibition par ces 3 molécules de ces deux voies cataboliques. De plus, mTOR et HIF-1α ont été décrits comme des activateurs de la glycolyse ce qui permet aussi d'expliquer la diminution de la glycolyse via l'inhibition de mTOR (pour la 6-MP et la rapamycine) et HIF-1α pour les 3 médicaments.

Par contre, en ce qui concerne le cycle de Krebs et l'OXPHOS, nos résultats ne peuvent pas s'expliquer *via* les «checkpoints» métaboliques, car dans la littérature il a été montré que HIF-1α et mTOR sont des inhibiteurs de ces voies. Dans nos expériences, nous observons une diminution de la production d'ATP par l'OXPHOS. Plusieurs explications sont à considérer. Tout d'abord, la 6-MP, le MPA et la rapamycine peuvent avoir des effets directs sur le fonctionnement mitochondrial, et dans ce contexte, la diminution de l'OXPHOS pourrait être expliquée par un effet indépendant des «checkpoints» métaboliques. Par exemple, il a été montré que la 6-MP inhibe directement la chaîne respiratoire dans un modèle de mitochondries isolées, avec une activation probable d'AMPK et une inhibition des autres «checkpoints» métaboliques [Porceddu et al. 2012]. De plus, le cycle de Krebs étant en connexion avec de nombreuses voies métaboliques, il n'est donc pas exclusivement régulé par les «checkpoints» métaboliques, mais également par les

intermédiaires qui proviennent d'autres voies métaboliques. La compréhension des effets métaboliques de la 6-MP, le MPA et la rapamycine nécessite l'étude des autres voies qui convergent vers le cycle de Krebs. Ensuite, d'autres «checkpoints» métaboliques non régulés par les 3 médicaments pourraient favoriser le cycle de Krebs et l'OXPHOS. Enfin, il faut prendre en compte l'état énergétique de la cellule. En effet, si les médicaments induisent une carence énergétique importante en ATP, il est vraisemblable que l'activité des enzymes ATP-dépendantes sera ralentie, même si leur expression est régulée positivement par les «checkpoints» métaboliques.

III. Modulation pharmacologique du métabolisme énergétique: intérêt potentiel des «thérapies métaboliques»

L'importance du métabolisme dans le devenir des cellules cancéreuses et des lymphocytes T étant largement admise, les «checkpoints» métaboliques et les voies métaboliques associées constituent des centres d'intérêt pour la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques dans les maladies du système immunitaire et en cancérologie.

Il existe déjà des médicaments qui influencent le métabolisme cellulaire. Le cas le plus étudié est sans doute celui de la rapamycine, un inhibiteur direct du «checkpoint» métabolique mTOR, utilisée pour le traitement de différents cancers et plus fréquemment comme immunosuppresseur pour éviter le rejet de la greffe. Au niveau métabolique, la rapamycine induit une inhibition de mTOR associée à une inhibition de la glycolyse, un blocage de la différenciation des lymphocytes T effecteurs $CD4^+$ et une augmentation de la génération de lymphocytes T régulateurs et T mémoire. L'exemple de la rapamycine illustre bien comment une molécule initialement développée en tant qu'immunosuppresseur pour bloquer l'activation lymphocytaire (signal 3), contrôle vraisemblablement la prolifération lymphocytaire *via* de multiples effets sur le métabolisme des lymphocytes T.

D'autres molécules possèdent également des effets sur la reprogrammation métabolique (**Figure 25**). Le 2-désoxyglucose (2-DG) modifie le métabolisme par inhibition de la glycolyse. Sa structure est similaire à celle du glucose et, après phosphorylation par l'HK, le 2-DG phosphorylé est un inhibiteur de HK et par conséquent de la glycolyse [Allison et al. 2017]. Des essais précliniques et cliniques sont en cours pour tester son efficacité dans plusieurs types de cancers. A fortes doses on observe que la toxicité du 2-DG est importante et à faibles doses les résultats restent à confirmer. Un autre exemple est celui de la metformine, un inhibiteur du complexe I de la mitochondrie indiqué dans le diabète de type II. L'inhibition de la chaîne respiratoire aboutit à une réduction des concentrations d'ATP, ce qui entraîne une augmentation du ratio AMP:ATP et une activation d'AMPK. Une étude rétrospective avait montré que chez les patients diabétiques traités avec la metformine on observait une diminution de l'incidence des pathologies cancéreuses

[Decensi et al. 2010, Currie et al. 2012]. A partir des données récentes sur la reprogrammation métabolique, des essais cliniques de phase II et III ont été initiés pour valider ses effets anti-tumoraux [Salani et al. 2014, Allison et al. 2017].

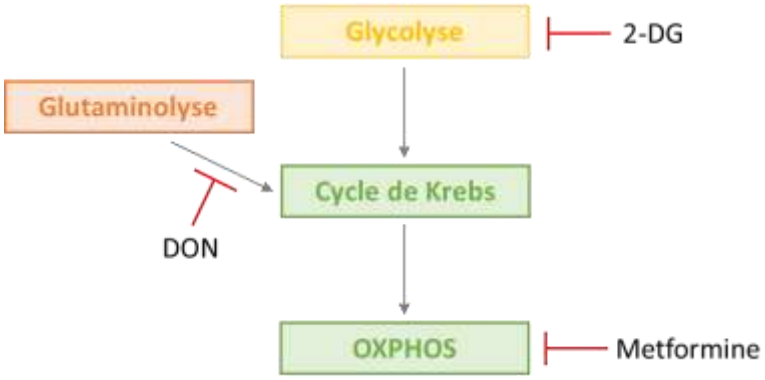


Figure 25. Action des molécules sur le métabolisme en cours d'essais cliniques.
La 2-DG inhibe la glycolyse, le DON la glutaminolyse et la metformine la chaîne respiratoire. 2-DG: 2-désoxyglucose; DON: 6-diazo-5-oxo-L-norleucine. Modifiée de: [Bettencourt and Powell 2017, Patel and Powell 2017].

Des molécules sont actuellement en cours d'évaluation pour inhiber spécifiquement différentes voies métaboliques. Dans le métabolisme des acides aminés, des inhibiteurs de la GLS1 sont en phase préclinique. Pour la glycolyse, des inhibiteurs du transport du glucose, de PFK2, de PKM2, de la LDHA et du MTC4 sont en cours d'évaluation clinique de même que des inhibiteurs de la synthèse des lipides, des nucléotides, du cycle de Krebs et de l'OXPHOS [Heiden 2011]. Il faudra attendre quelques années pour déterminer l'impact réel de ces molécules dans le traitement du cancer et des maladies du système immunitaire.

Alors que la reprogrammation métabolique est étroitement liée à l'activation, la différenciation et les fonctions lymphocytaires, des études ont montré comment en ciblant le métabolisme cellulaire on pouvait moduler la réponse immunitaire en favorisant ou en bloquant l'émergence de sous-types lymphocytaires [Patel and Powell 2017]. Ce domaine de recherches a conduit au concept de ciblage pharmacologique spécifique de populations lymphocytaires («cellular selectivity on demand», en anglais) dans le but de traiter des pathologies liées au système immunitaire, comme le rejet de l'allogreffe, les maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux disséminé (LED) ou les MICI.

III.1. La transplantation d'organes solides

Dans le cas de la transplantation d'organes solides, les cellules à l'origine du rejet du greffon utilisent surtout la glycolyse aérobie pour leur production énergétique, c'est-à-dire un métabolisme similaire à celui qu'on observe pendant l'activation lymphocytaire physiologique. Dans des modèles murins de transplantation de peau et de cœur, la combinaison du 2-DG avec la

metformine inhibe la glycolyse des lymphocytes T activés avec diminution de la production des cytokines et de la prolifération cellulaire. L'addition de DON (6-diazo-5-oxo-L-norleucine), un analogue de la glutamine qui inhibe sa captation et son métabolisme, induit une diminution plus importante de la réponse immunitaire. Au final, cette triple combinaison inhibe la prolifération des lymphocytes T effecteurs $CD4^+$ et $CD8^+$, et permet de réduire la survenue du rejet. De plus, ce traitement favorise la génération de lymphocytes T régulateurs utilisant préférentiellement l'oxydation des acides gras, dont la différenciation n'est donc pas impactée par cette combinaison de molécules [Lee et al. 2015, Yap et al. 2015, Bettencourt and Powell 2017]. Ces expériences démontrent qu'en régulant le métabolisme, il n'y a pas d'inhibition globale du système immunitaire, mais que le traitement agit sélectivement selon le type cellulaire.

L'immunotolérance, définie comme l'acceptation indéfinie du tissu greffé avec le maintien de la fonction rénale, est l'objectif à atteindre après une transplantation d'organe. Dans l'immunotolérance spontanée ou induite par les médicaments, il y a une augmentation des Tregs dans la greffe. La rapamycine, un inhibiteur de mTOR augmente la tolérance de l'allogreffe par augmentation des Tregs tandis que les inhibiteurs de la calcineurine inhibent à la fois les lymphocytes T effecteurs et Tregs [Shan et al. 2014]. L'induction de la tolérance à long terme est importante pour résoudre les problèmes associés aux immunosuppresseurs et les Tregs jouent un rôle majeur. Il faudra vérifier l'induction des Tregs par les autres immunosuppresseurs disponibles ou par les nouvelles molécules en développement qui ciblent le métabolisme pour maximiser la différenciation des lymphocytes T en Tregs.

III.2. Les maladies auto-immunes: l'exemple du lupus érythémateux disséminé

Les altérations métaboliques dans les maladies auto-immunes font l'objet de recherches pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Nous utiliserons l'exemple du LED pour montrer l'intérêt de l'étude de la reprogrammation métabolique dans les pathologies auto-immunes.

Actuellement, le traitement pour le LED est basé sur des immunosuppresseurs généralisés comme l'azathioprine et le MPA. Les infections à répétition dues à une immunosuppression constante du système immunitaire par les traitements à long terme représentent une cause majeure de mortalité. La modulation du métabolisme dans les patients atteints de LED constitue une alternative thérapeutique, car il existe des altérations métaboliques dans les lymphocytes T $CD4^+$. En effet, au cours du LED, il existe une hyper-activation des lymphocytes T $CD4^+$ avec une glycolyse et un métabolisme oxydatif mitochondrial augmentés s'accompagnant d'une élévation de l'oxydation de la glutamine et des acides gras. De plus, l'augmentation du métabolisme des T $CD4^+$ est associée à une activation de mTORC1 et une inhibition de mTORC2. L'activation de mTORC1 dans les lymphocytes T $CD4^+$ favorise la glycolyse et bloque l'autophagie, ce qui contribue au

dysfonctionnement mitochondrial. De plus, la consommation du glucose est augmentée, avec l'activation de la voie des pentoses phosphates, pour permettre la prolifération cellulaire, et de l'oxydation du glucose (contrairement aux lymphocytes T activés), et l'augmentation de certains transporteurs de glucose. Le traitement par la rapamycine peut inverser ces effets dans les lymphocytes T [Choi et al. 2016, Perl 2016, Morel 2017].

Dans un modèle de souris transgéniques du LED, Yin et *al*. ont évalué l'efficacité d'un traitement associant le 2-DG et la metformine, permettant de réduire simultanément la glycolyse et l'OXPHOS. Les auteurs ont mis en évidence la normalisation du métabolisme dans les lymphocytes T $CD4^+$ hyperactivés avec une réversion du phénotype pathologique, incluant l'activation lymphocytaire T, la production d'auto-anticorps et l'atteinte rénale. Dans ce modèle, la combinaison 2-DG/metformine a permis de réduire la glycolyse et la consommation d'oxygène par la mitochondrie et d'inhiber la voie mTOR. Cette étude a démontré la faisabilité d'une réversion *in vivo* de l'«immuno-phénotype» de manière ciblée puisque dans les cellules non activées il n'y avait pas de modification de leur métabolisme. Enfin, dans des expériences *in vitro* à partir de lymphocytes T humains de patients LED, le métabolisme était de manière similaire normalisé après le traitement. Il est intéressé de noter que l'administration en monothérapie du 2-DG ou de la metformine à des doses équivalentes n'a pas permis d'obtenir la même efficacité [Mehta and Chandel 2015, Yin et al. 2015, Bettencourt and Powell 2017, Patel and Powell 2017]. Même si les effets indésirables ou l'efficacité à long terme restent à évaluer dans des essais cliniques chez les patients LED, ces résultats offrent de nouvelles perspectives de traitement dans le LED.

L'azathioprine (précurseur de la 6-MP) avec le MTX sont utilisés dans le traitement d'entretien du LED. Dans notre modèle, nous avons montré que la 6-MP inhibe mTOR. Sachant que mTORC1 est activée dans le LED, l'efficacité de l'azathioprine pourrait être en partie expliquée par cette modulation métabolique. Des études avec des lymphocytes T provenant de patients avec LED pour analyser les effets de l'azathioprine en combinaison avec la 2-DG et/ou la metformine pourraient offrir de nouvelles perspectives de combinaisons thérapeutiques chez les malades. Avec le même raisonnement, les effets de la rapamycine et du MPA dans les LED, en association avec d'autres modulateurs du métabolisme pourraient être testés dans des lymphocytes en culture primaire. Dans notre modèle le MPA n'inhibait pas mTOR, cependant l'impact du MPA sur d'autres «checkpoints» métaboliques a été montré et il est donc potentiellement un modulateur du métabolisme dans les lymphocytes T $CD4^+$ des patients atteints de LED.

III.3. Les MICI

Les MICI sont des maladies complexes car elles impliquent une dérégulation de la barrière épithéliale et du système immunitaire inné et adaptatif. Dans la maladie de Crohn on observe une dérégulation de la balance des lymphocytes T, avec une augmentation des Th1 et Th17 (pro-inflammatoires) avec diminution des Tregs (anti-inflammatoires). Parmi les facteurs prédisposant à

la maladie on sait que des polymorphismes de l'IL-23R, le récepteur d'IL-23 peuvent influencer le risque de survenue de la pathologie. Les cellules dendritiques sécrètent IL-23 qui se fixe au récepteur IL-23R et favorise la différenciation des lymphocytes T effecteurs en Th17. Il a été montré que les bactéries du microbiote produisent des métabolites qui peuvent modifier le développement et la fonction des lymphocytes T. Par exemple, des acides gras à courte chaîne comme le butyrate modifient la balance des Th17 et des Tregs avec altération de l'activation de mTOR. Cela pourrait être un point de départ pour la compréhension des modifications métaboliques lymphocytaires, induites notamment par des facteurs génétiques ou par le microbiote, et leur implication dans la prolifération des lymphocytes Th17, «marqueurs immunologiques» de la maladie de Crohn [O'Sullivan and Pearce 2015].

Malgré les connaissances actuelles sur l'importance de la reprogrammation métabolique dans la différenciation des sous-types de lymphocytes T, aucune étude *in vitro* ou clinique n'a été publiée pour valider l'intérêt potentiel de cibler le métabolisme lymphocytaire chez les patients atteints de MICI. La combothérapie associant l'azathioprine et les anti-TNF est l'option de choix pour le traitement des MICI, mais on ne dispose pas d'informations sur les effets de ce traitement sur le métabolisme lymphocytaire. Or, on sait que le TNF-α, cytokine pro-inflammatoire, intervient dans le métabolisme cellulaire et tout particulièrement dans l'homéostasie lipidique. Il a été montré qu'il modifie le métabolisme lipidique par diminution de la captation des acides gras libres, activation de la lipogenèse, régulation de l'activité d'enzymes importantes (lipoprotéine lipase, acétyl-CoA carboxylase) et régulation du métabolisme du cholestérol [Plomgaard et al. 2008, Chen et al. 2009, Parmentier-Decrucq et al. 2009].

Dans les macrophages, l'induction de GLUT1 induit un état pro-inflammatoire avec augmentation de la production de TNF-α, montrant que le métabolisme peut modifier l'état inflammatoire [Freemerman et al. 2014].

L'étude des effets des traitements anti-TNF-α (en monothérapie ou en association avec l'azathioprine) sur le métabolisme permettra une meilleure compréhension des mécanismes métaboliques mis en jeu. D'autres combinaisons de molécules qui modulent le métabolisme, pourraient permettre d'élargir l'arsenal thérapeutique disponible pour la prise en charge thérapeutique des MICI. Enfin, à l'issue de nos travaux, il nous paraît intéressant d'émettre l'hypothèse qu'une modulation métabolique différente pourrait en partie expliquer que des immunosuppresseurs (azathioprine, MTX) ont un effet bénéfique dans la maladie de Crohn alors que d'autres comme le MPA est peu efficace.

L'ensemble de ces études confortent l'intérêt porté par notre groupe à l'analyse des effets des médicaments immunosuppresseurs sur la reprogrammation métabolique. Nous avons fait l'hypothèse de l'influence des molécules antiprolifératives sur la reprogrammation métabolique. Outre la 6-MP et le MPA pour lesquels nous avons pu caractériser les effets sur le métabolisme, il apparaît intéressant d'élargir nos recherches à d'autres médicaments connus pour moduler des

voies métaboliques importantes pour la prolifération. On peut citer en particulier le MTX, inhibiteur de la méthylène tétra-hydrofolate réductase (MTHR) et du métabolisme des folates [Heiden 2011]. Les stratégies thérapeutiques pourront évaluer de nouvelles combinaisons de molécules pour améliorer l'efficacité et augmenter la spécificité des traitements et ainsi diminuer les effets secondaires. Il s'agit de moduler de manière ciblée le système immunitaire sans induire une immunosuppression généralisée. Jusqu'à très récemment, le développement des immunosuppresseurs était basé sur le blocage des différents signaux d'activation (par exemple, inhibiteurs de la calcineurine et le signal 1, les antiprolifératifs et le signal 3). Aujourd'hui, une partie de la recherche de nouveaux médicaments immunosuppresseurs s'oriente vers la modulation du métabolisme lymphocytaire. Les résultats issus de mes travaux de thèse nous conduisent à proposer que l'utilisation des immunosuppresseurs classiques (6-MP, MPA, rapamycine), qui ont un impact eux-mêmes sur le métabolisme, en combinaison avec d'autres molécules ciblant plus spécifiquement les voies métaboliques lymphocytaires pourrait s'avérer une option thérapeutique intéressante. L'objectif sera d'adapter la combinaison thérapeutique à chaque maladie en fonction du profil métabolique des cellules immunes à contrôler en vue de diminuer les concentrations des immunosuppresseurs et réduire leurs effets secondaires tout en maintenant leur efficacité.

IV. Reprogrammation métabolique et traitements anti-cancéreux: influence du métabolisme des lymphocytes T

Le rôle du microenvironnement tumoral et des lymphocytes péri-tumoraux ou infiltrés (TILs, de l'anglais, tumor-infiltrating lymphocytes) est devenu un axe de recherche très étudié. La présence de TILS est un facteur pronostique favorable en limitant le développement tumoral. Les cellules cancéreuses représentent un défi pour le système immunitaire car ce sont des cellules du soi peu immunogéniques. De plus, le microenvironnement tumoral exerce un effet immunosuppresseur sur les lymphocytes T en raison de faibles concentrations en oxygène, un pH acide et un apport limité en nutriments. Enfin, les cellules cancéreuses interagissent directement avec les TILs pour moduler leur activité par blocage du métabolisme énergétique avec pour conséquence l'inhibition de leur différenciation en lymphocytes T effecteurs [Allison et al. 2017]. Les signaux du microenvironnement tumoral peuvent inhiber le métabolisme oxydatif dans les TILs, aboutissant à des lymphocytes T effecteurs présentant finalement une carence énergétique [Scharping et al. 2016].

Grace à une meilleure connaissance du microenvironnement tumoral, une révolution dans le traitement du cancer basée sur des médicaments qui vont activer le système immunitaire (immunothérapie) plutôt que de cibler directement la tumeur a pu émerger ces dernières années. Le succès récent des immunothérapies dans des cancers agressifs comme le mélanome métastatique, démontre l'efficacité anti-tumorale des TILs expliquée aussi par la réduction des

effets immunosuppresseurs des cellules cancéreuses sur les TILs [Chang et al. 2015, Allison et al. 2017]. Cependant, les résultats parfois insuffisants de l'immunothérapie font envisager d'autres stratégies thérapeutiques pour améliorer leur efficacité.

Les cellules cancéreuses et les lymphocytes T activés peuvent réorienter leur métabolisme pour permettre une croissance et une prolifération cellulaire rapide, avec des profils métaboliques similaires [Allison et al. 2017]. Dans une tumeur, ces deux types cellulaires, les cellules cancéreuses et les TILs coexistent, avec les mêmes besoins métaboliques prolifératifs. Des études précliniques et cliniques ont démarré pour tester de nouvelles molécules qui ciblent le métabolisme des cellules cancéreuses, et qui pourraient moduler de façon simultanée le métabolisme des TILs. Il est donc crucial de caractériser les conséquences d'une dérégulation du métabolisme lymphocytaire dans le contexte tumoral avant d'envisager des thérapies métaboliques aux conséquences potentiellement délétères sur l'activité anti-tumorale des populations lymphocytaires péri-tumorales [Jiang and Yan 2016].

Si le traitement consiste à inhiber la glycolyse aérobie, les résultats peuvent aboutir à l'arrêt de la prolifération des cellules cancéreuses, mais les mêmes effets pourraient être observés dans les TILs. Dans certaines études, la rapamycine diminue la prolifération des cellules cancéreuses mais dans d'autres, quand le microenvironnement tumoral est pris en considération, elle inhibe aussi le recrutement des lymphocytes T [Chaoul et al. 2015]. Les cellules tumorales et les lymphocytes T activés ayant un métabolisme similaire, le ciblage des «checkpoints» métaboliques ou des intermédiaires du métabolisme peuvent agir sur les deux types cellulaires, aboutissant globalement à l'absence d'effet anti-tumoral. La prise en compte de facteurs comme l'hétérogénéité tumorale, la dose à administrer, la durée, les différentes molécules disponibles et les combinaisons entre elles permettra l'optimisation de ces nouvelles stratégies thérapeutiques tant en terme d'efficacité que de spécificité [Chang and Pearce 2016, Jiang and Yan 2016]. Par exemple, les transporteurs du glucose sont exprimés de façon variable en fonction du type cellulaire, aussi le ciblage de ceux qui sont exprimés par les cellules cancéreuses et pas par les lymphocytes T pourrait être une option thérapeutique [Ho et al. 2015, O'Sullivan and Pearce 2015].

Les lymphocytes T sont aussi régulés par les «immune checkpoints», des protéines qui régulent la réponse immunitaire pour maintenir l'auto-tolérance et prévenir des réactions inflammatoires exacerbées. La caractérisation des effets de la combinaison de molécules inhibitrices du métabolisme tumoral et de certains «immune checkpoints» dans les lymphocytes dans le but de favoriser la réponse immune contre la tumeur fait l'objet de recherches en vue de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Plusieurs molécules qui régulent les signaux d'activation immunitaire ont été classées comme «immune checkpoints», comprenant notamment CTLA-4 et PD-1/PD-L1 (programmed cell death protein 1/ programmed death-ligand 1) identifiés comme des inhibiteurs de la réponse immunitaire. Le récepteur CTLA-4 est exprimé par les lymphocytes T

après activation et inhibe les fonctions effectrices de la cellule pour maintenir l'homéostasie immunologique. La liaison de CTLA-4 à son ligand entraîne l'inhibition de la glycolyse sans modification de l'oxydation des acides gras puis le blocage de l'activation et de la différenciation des TILs naïfs [Jiang and Yan 2016]. Les inhibiteurs de CTLA-4, comme l'Ipilimumab (Yervoy®, Bristol Myers Squibb), indiqué dans les mélanomes métastatiques, bloquent CTLA-4 pour favoriser la réponse immunitaire contre la tumeur en favorisant l'activation lymphocytaire avec modulation du métabolisme cellulaire [Mockler et al. 2014]. PD-1 est un récepteur avec des fonctions inhibitrices qui interagit avec ses ligands PD-L1 ou PD-L2. PD-L1 est exprimé dans les cellules du soi pour réguler la tolérance périphérique. Des études récentes suggèrent que l'inhibition de PD-1 modifie le métabolisme des cellules T et cancéreuses. La fixation d'un inhibiteur sur PD-1 favorise les fonctions effectrices des TILs. De plus, le blocage de PD-L1 dans les cellules tumorales diminue l'entrée du glucose et le lactate extracellulaire par inhibition de mTOR. Cela suggère que PD-L1 des cellules cancéreuses se fixe à PD-1 des lymphocytes T pour favoriser le métabolisme des cellules cancéreuses et diminuer celui des TILs [Biswas 2015, Chang et al. 2015, Allison et al. 2017]. De plus, la voie PD-1/PD-L1 peut induire également la reprogrammation métabolique des lymphocytes T [Biswas 2015].

La combinaison des immunothérapies avec les thérapies métaboliques pourrait constituer une stratégie innovante pour améliorer l'efficacité anti-tumorale des traitements tout en limitant leur toxicité en ciblant le métabolisme des cellules cancéreuses pour bloquer leur prolifération et en favorisant la réponse immune pour induire la mort des cellules tumorales.

PERPECTIVES ET CONCLUSIONS

Perspectives

Ce travail de thèse pourra être poursuivi par l'exploration: i) des effets de ces molécules sur d'autres voies métaboliques impliquées en particulier dans la reprogrammation métabolique; ii) l'étude des effets de ces molécules sur un modèle de PBMC ou une 2ème lignée; iii) analyse des différences métaboliques dans le modèle LCL entre les lignées résistantes et sensibles à la 6-MP et; iv) analyse des effets d'un autre immunosuppresseur antiprolifératif comme le MTX.

- Effets des immunosuppresseurs sur d'autres voies métaboliques

Le métabolisme cellulaire est complexe avec de nombreuses voies qui interagissent entre elles. Nous nous sommes focalisés sur la glycolyse, la glutaminolyse et les «checkpoints» métaboliques. Une caractérisation plus détaillée de la glycolyse et de la glutaminolyse, l'analyse de la voie des pentoses phosphates, des lipides et le fonctionnement de la mitochondrie seront nécessaires.

L'importance de la mitochondrie dans la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses et des cellules du système immunitaire a été établie. La mitochondrie n'est pas seulement un organite qui génère de l'énergie, mais c'est aussi le lieu de synthèse de molécules indispensables pour la croissance et la prolifération cellulaire. De plus, elle participe à la régulation de la balance redox et des concentrations de calcium. Le métabolisme des acides gras a également un rôle prépondérant dans la reprogrammation métabolique. Il serait donc très intéressant d'approfondir nos connaissances sur les effets des immunosuppresseurs dans le métabolisme lipidique et mitochondrial. Enfin, l'identification de molécules pour corriger des altérations génétiques innées mitochondriales qui induisent une modification de l'oxydation des acides gras ou de la chaîne respiratoire pourrait aboutir à élargir leur utilisation dans d'autres pathologies.

- Validation des résultats: modèle PBMC ou 2ème lignée

La lignée Jurkat est un modèle pertinent pour valider les hypothèses d'autres modèles *ex-vivo* chez l'Homme ou *in vivo* chez un modèle murin sont nécessaires pour confirmer les résultats. Dans le cas de la 6-MP, l'étude dans une 2ème lignée leucémique serait importante pour valider les données. Cependant l'obtention de sang total ou de moelle osseuse provenant de patients atteints de LAL pourrait être l'étape suivante pour la validation de nos conclusions et l'extrapolation en situation clinique de nos résultats. Pour la 6-MP, le MPA et la rapamycine, l'étude de leurs effets immunosuppresseurs devra être validée dans un modèle cellulaire *ex-vivo*. Dans un premier temps, il faudrait évaluer les traitements dans un modèle de PBMC de sujets sains. Cela permettra de caractériser la dose optimale de médicament, les conditions de culture et la réponse de ces cellules aux traitements. Ensuite, des échantillons provenant de patients pourront être analysés par exemple des patients atteints des MICI ou après transplantation.

- LCL sensibles et résistantes à la 6-MP: différences métaboliques ?

Pendant mon projet de Master et le projet de thèse du Dr. Laurent Chouchana, nous avons utilisé un autre modèle cellulaire, les LCL (**Article 0**). Ce modèle permet d'identifier les différences interindividuelles en réponse aux médicaments. Étant donné que 6 lignées «sensibles» et 5 lignées «résistantes» à la 6-MP ont été caractérisées au laboratoire, la recherche de différences métaboliques entre ces lignées en fonction de leur réponse à la 6-MP pourra être réalisée. Cela pourrait aboutir à la découverte de marqueurs de résistance ou de sensibilité à la 6-MP impliqués dans le métabolisme cellulaire.

- Méthotrexate: un immunosuppresseur antiprolifératif

Le MTX est un médicament antiprolifératif très utilisé dans la phase de consolidation et d'entretien de la LAL en combinaison avec la 6-MP [Inaba et al. 2013, Mei et al. 2015]. Dans la littérature, les effets du MTX sur les «checkpoints» métaboliques ont été rapportés dans différents modèles cellulaires. Par exemple, le MTX diminue Myc et active la voie AMPK [Serra et al. 2008, Thornton et al. 2015]. Enfin le MTX inhibe le complexe III de la chaîne respiratoire et diminue le coefficient respiratoire [Yamamoto et al. 1988]. L'étude des effets du MTX dans la lignée Jurkat, et dans une 2ème lignée de leucémie, comme MOLT-4, ainsi que des études en combinaison avec la 6-MP pourront fournir des données sur les mécanismes d'action de ces médicaments et de leur interaction pour mieux comprendre leur efficacité et leurs effets indésirables.

L'étude des effets du MTX sur la reprogrammation métabolique dans la lignée cellulaire Jurkat est actuellement en cours dans le laboratoire. Les résultats préliminaires sont similaires à ceux de la 6-MP: inhibition des «checkpoints» métaboliques mTOR, HIF-1α et Myc et altération de l'expression de gènes impliqués dans la glycolyse, la glutaminolyse et la synthèse de nucléotides. La réalisation d'études fonctionnelles puis l'analyse d'autres voies métaboliques seront réalisées par la suite.

Conclusions

Ce travail de thèse a permis pour la première fois de mettre en évidence les effets des médicaments immunosuppresseurs comme la 6-MP, le MPA et la rapamycine sur la reprogrammation métabolique dans une lignée Jurkat de lymphocytes T humains. Nous avons montré que les trois médicaments inhibent HIF-1α et Myc et que seules la 6-MP et la rapamycine inhibent mTOR. Sachant que ces «checkpoints» métaboliques ont été décrits comme modulateurs du métabolisme (glycolyse, cycle de Krebs, OXPHOS, synthèse des lipides, oxydation des acides gras, glutaminolyse et voie des pentoses phosphates), à partir de nos résultats et de ceux issus de la littérature nous proposons plusieurs hypothèses sur les effets de ces trois médicaments immunosuppresseurs concernant la modulation des voies métaboliques des lymphocytes T (**Figure 26**):

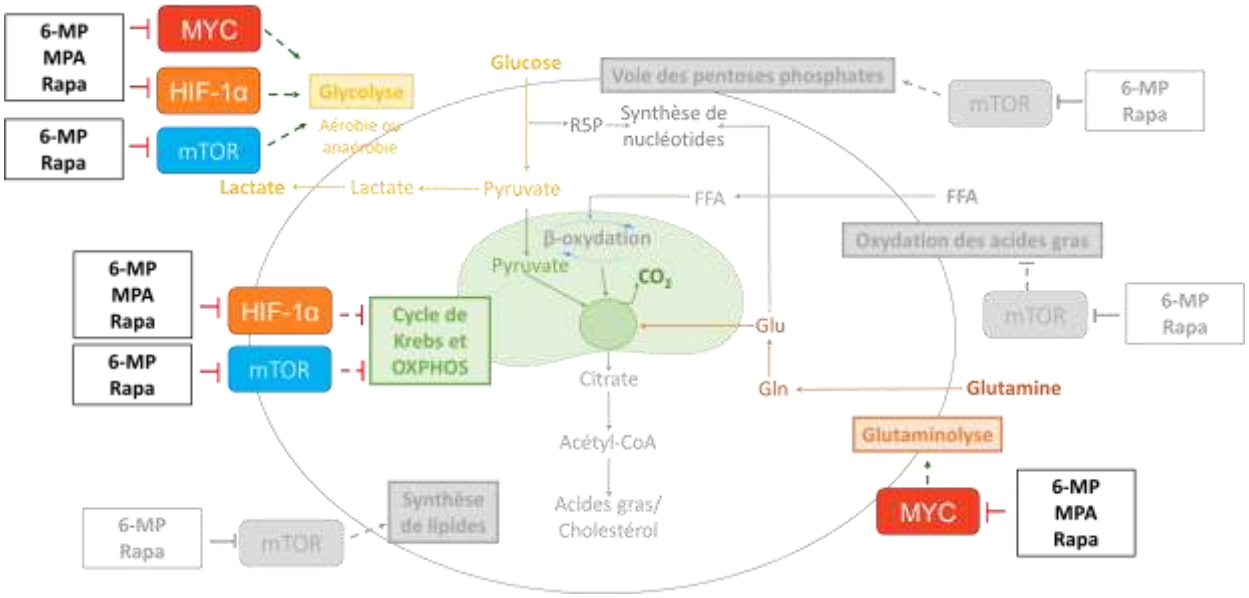


Figure 26. Schéma récapitulatif des effets des trois médicaments sur les «checkpoints» métaboliques et le métabolisme cellulaire.
Dans notre modèle Jurkat, la 6-MP, le MPA et la rapamycine inhibent Myc et HIF-1α et la 6-MP et la rapamycine inhibent mTOR. Ce schéma représente les conséquences hypothétiques de ces 3 médicaments sur le métabolisme cellulaire. 6-MP: 6-mercaptopurine; acétyl-CoA: acétyl coenzyme A; FFA: acides gras libres; Gln: glutamine; Glu: acide glutamique; HIF-1α: facteur inductible par l'hypoxie 1 α; MPA: acide mycophénolique; R5P: mTOR: cible de la rapamycine chez les mammifères; OXPHOS: phosphorylation oxydative; ribose-5-phosphate; Rapa: rapamycine.

Nos travaux *in vitro* mettent en lumière les effets de la 6-MP, du MPA et de la rapamycine sur des altérations métaboliques dans les lymphocytes T prolifératifs. Ces résultats originaux offrent l'opportunité de concevoir de nouvelles les combinaisons thérapeutiques de médicaments antiprolifératifs dans le contexte des pathologies cancéreuses mais aussi immunologique comme dans les maladies auto-immunes, les MICI et après transplantation rénale.

ANNEXE

Médicament	Date de mise sur le marché	Métabolisme	Mécanismes d'action	Pharmacogénétique (polymorphismes d'intérêt)	Indications thérapeutiques	Effets indésirables	Effets sur le métabolisme
6-MP (AZA)	1953	• Voies cataboliques : par la TPMT formant les 6MMP (R) et par la XO produisant l'acide thiourique • Voie anabolique : par l'HPRT donnant des métabolites actifs (6-MMP (R) et 6-TGN)	• Inhibition de la synthèse *de novo* des purines par les 6-MMP (R) • Apoptose par incorporation dans l'ADN des 6-TGN • Inhibition de Rac1	TPMT NUDT15 ITPA	• Maladies auto-immunes: PR, LED • MICI (AZA) • Transplantation rénale (AZA) • LAM et LAL	Myélotoxicité et intolérance gastro-intestinale	• Effets sur: PI3K/Akt/mTOR et HIF-1α • Effet direct sur le fonctionnement mitochondrial (mitochondries isolées)
MPA	1990	• Métabolite principal: MPAG (métabolite inactif) par l'UGTXX • Autre métabolite: AcMPAG par l'UGTXX	Inhibition réversible de l'IMPDH impliquée dans la synthèse *de novo* des purines	UGT1A9, 1A8, 2B7 OATP MRP-2 IMPDH	• Maladies auto-immunes: LED • Prévention des rejets après transplantation d'organes solides	• Toxicité Hématologique et gastro-intestinale • Risque d'infections et de néoplasies augmenté	• Effets sur: PI3K/Akt/mTOR, HIF-1α et Myc • Modification du potentiel membranaire mitochondrial (apoptose)
Tacrolimus	1994	• Métabolisé par le CYP3A4 et CYP3A5 • Plus de 15 métabolites, principaux: 13-O-déméthyl-tacrolimus et 31-O-déméthyl-tacrolimus	• Complexe tacrolimus-FKBP12: inhibition de la calcineurine et de la voie JNK et p38 • Augmentation de l'expression de TGF-β1	CYP3A5 CYP3A4 ABCB1	Prévention du rejet du greffon (foie, rein, cœur)	• Néphrotoxicité aiguë et chronique • Troubles métaboliques et neurologiques	• Inhibition d'HIF-1α • Augmentation de l'endocytose de GLUT4 • Déplétion ATP par un effet sur l'OXPHOS (mitochondries isolées)
Rapamycine	1999	• Métabolisé par le CYP3A4 et CYP3A5 • O-déméthylé ou hydroxylé en 7 métabolites principaux	Inhibition de mTOR par formation du complexe rapamycine-FKBP12	CYP3A5 CYP3A4 ABCB1	• Prévention du rejet du greffon • Indications ciblées en cancérologie	• Pneumonie, infections • toxicité hématologique • Altérations métaboliques	• Inhibiteur de mTOR • Déplétion ATP par un effet sur l'OXPHOS (mitochondries isolées) • Diminution transcription gènes impliqués dans l'oxydation mitochondrial

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abraham C and Cho JH "Inflammatory bowel disease." N Engl J Med 2009. **361**(21): 2066-2078.

Abraham RT "Mutant T cell lines as model systems for the dissection of T cell antigen receptor signaling pathways." Immunol Res 2000. **22**(2-3): 95-117.

Abraham RT "Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm." Nat Rev Immunol 2004. **4**: 301-308.

Allison AC "Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward." Immunopharmacology 2000. **47**: 63-83.

Allison AC and Eugui EM "The design and development of an immunosuppressive drug, mycophenolate mofetil." Springer Semin Immunopathol 1993. **14**: 353-380.

Allison AC and Eugui EM "Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action." Immunopharmacology 2000. **47**: 85-118.

Allison KE, Coomber BL and Bridle BW "Metabolic reprogramming in the tumour microenvironment: a hallmark shared by cancer cells and T lymphocytes." Immunology 2017.

Anglicheau D, Thervet E, Etienne I, Ligny BHD, Meur YL, Touchard G, Büchler M, Laurent-Puig P, Tregouet D, Beaune P, Daly A, Legendre C and Marquet P "CYP3A5 and MDR1 genetic polymorphisms and cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation." Clin Pharmacol Ther 2004. **75**(5): 422-433.

Ansari A, Aslam Z, Sica AD, Smith M, Gilshenan K, Fairbanks L, Marinaki A, Sanderson J and Duley J "Influence of xanthine oxidase on thiopurine metabolism in Crohn's disease." Aliment Pharmacol Ther 2008. **28**(6): 749-757.

ANSM 2010. "Résumé des caractéristiques du produit Imurel (azathioprine)." Retrieved 19/04/2017, from http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0168346.

ANSM 2012. "Base de données publique des médicaments - Tacrolimus." Retrieved 08/05/2017, from http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=68514894&typedoc=R.

ANSM 2013. "Résumé des caractéristiques du produit Purinethol (mercaptopurine)." Retrieved 19/04/2017, from http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0223733.

ANSM 2014. "Base de données publique des médicaments - Néoral (ciclosporine) - capsule molle." Retrieved 09/05/2017, from http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=67194943&typedoc=R.

ANSM 2016a. "Base de données pubique des médicaments - Sandimmun (ciclosporine) - perfusion." Retrieved 09/05/2017, from http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=62935801&typedoc=R.

ANSM 2016b. "Base de données publique des médicaments. Azathioprine." Retrieved 19/04/2017, from http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=60211183&typedoc=R.

Appel AS and Appel GB "An update on the use of mycophenolate mofetil in lupus nephritis and other primary glomerular diseases." Nat Rev Nephrol 2009. **5**: 132-142.

Araki K, Youngblood B and Ahmed R "The role of mTOR in memory CD8+ T-cell differentiation." Immunol Rev 2010. **235**: 234-243.

Assche GV, Dignass A, Panes J, Beaugerie L, Karagiannis J, Allez M, Ochsenkühn T, Orchard T, Rogler G, Louis E, Kupcinskas L, Mantzaris G, Travis S and Stange E "The second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis." J Crohns Colitis 2010. **4**: 7-27.

Astoul E, Edmunds C, Cantrell DA and Ward SG "PI 3-K and T-cell activation: limitations of T-leukemic cell lines as signaling models." Trends Immunol 2001. **22**(9): 490-496.

Balagué C, Kunkel SL and Godessart N "Understanding autoimmune disease: new targets for drug discovery." Drug Discov Today 2009. **14**(19/20): 926-934.

Balssa L, Bittard H and Kleinclauss F "Immunosuppression en transplantation rénale." Prog Urol 2011. **21**(4): 250-253.

Barbarino JM, Staatz CE, Venkataramanan R, Klein TE and Altman RB "PharmGKB summary: cyclosporine and tacrolimus pathways." Pharmacogenet Genomics 2013. **23**(10): 563-585.

Barraclough KA, Lee KJ and Staatz CE "Pharmacogenetic influences on mycophenolate therapy." Pharmacogenomics 2010. **11**(3): 369-390.

Bartelt RR, Cruz-Orcutt N, Collins M and Houtman JCD "Comparison of T cell receptor-induced proximal signaling and downstream functions in immortalized and primary T cells." Plos One 2009. **4**(5): 1-16.

Basu A, Banerjee P, Contreras AG, Flynn E and Pal S "Calcineurin inhibitor-induced and ras-mediated overexpression of VEGF in renal cancer cells involves mTOR through the regulation of PRAS40." Plos One 2011. **6**(8): e23919-e23919.

Basu A, Banerjee P and Pal S "Critical role of mTOR in calcineurin inhibitor-induced renal cancer progression." Cell Cycle 2012. **11**(4): 633-634.

Baumgart DC and Carding SS "Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology." Lancet 2007. **369**: 1627-1640.

Beesley AH, Firth MJ, Anderson D, Samuels AL, Ford J and Kees UR "Drug-gene modeling in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia highlights importance of 6-mercaptopurine for outcome." Cancer Res 2013. **73**(9): 2749-2759.

Beloribi-Djefaflia S, Vasseur S and Guillaumond F "Lipid metabolic reprogramming in cancer cells." Oncogenesis 2016. **5**(e189).

Benedek T "Methotrexate: from its introduction to non-oncologic therapeutics to anti-TNF-α." Clin Exp Rheumatol 2010. **28**(Suppl 61): S3-S8.

Bergan S, Bentdal O, SøDAL G, Brun A, Rugstad H and Stokke O "Patterns of azathioprine metabolites in neutrophils, lymphocytes, reticulocytes, and erythrocytes: relevance to toxicity and monitoring in recipients of renal allografts." Ther Drug Monit 1997. **19**(5): 502-509.

Bettencourt IA and Powell JD "Targeting metabolism as a novel therapeutic approach to autoimmunity, inflammation, and transplantation." J Immunol 2017. **198**: 999-1005.

Biswas SK "Metabolic reprogramming of immune cells in cancer progression." Immunity 2015. **43**(3): 435-449.

Blagih J, Coulombe F, Vincent EE, Dupuy F, Galicia-Vazquez G, Yurchenko E, Raissi TC, van der Windt GJ, Viollet B, Pearce EL, Pelletier J, Piccirillo CA, Krawczyk CM, Divangahi M and Jones RG "The energy sensor AMPK regulates T cell metabolic adaptation and effector responses in vivo." Immunity 2015. **42**(1): 41-54.

Bluestone JA, Trotta E and Xu D "The therapeutic potential of regulatory T cells for the treatment of autoimmune disease." Expert Opin Ther Targets 2015. **19**(8): 1091-1103.

Bolon B "Cellular and molecular mechanisms of autoimmune disease." Toxicol Pathol 2012. **40**: 216-229.

Bouma G and Strober W "The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease." Nat Rev Immunol 2003. **3**: 521-533.

Bowman LJ and Brennan DC "The role of tacrolimus in renal transplantation." Expert Opin Pharmacother 2008. **9**(4): 635-643.

Brökers N, Le-Huu S, Vogel S, Hagos Y, Katschinski DM and Kleinschmidt M "Increased chemoresistance induced by inhibition of HIF-prolyl-hydroxylase domain enzymes." Cancer Sci 2009. **101**(1): 129-136.

Bronk J, Lister N and Shaw M "Transport and metabolism of 6-thioguanine and 6-mercaptopurine in mouse small intestine." Clin Sci (Lond) 1988. **74**(6): 629-638.

Buchholz M, Schatz A, Wagner M, Michl P, Linhart T, Adler G, Gress TM and Ellenrieder V "Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca+2/calcineurin signaling pathway." The EMBO Journal 2006. **25**: 3714-3724.

Buck MD, O'Sullivan D and Pearce EL "T cell metabolism drives immunity." J Exp Med 2015. **212**(9): 1345-1360.

Burkholder B, Huang R-Y, Burgess R, Luo S, Jones VS, Zhang W, Lv Z-Q, Gao C-Y, Wang B-L, Zhang Y-M and Huang R-P "Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks." Biochim Biophys Acta 2014. **1845**: 182-201.

Cairns RA, Harris IS and Mak TW "Regulation of cancer cell metabolism." Nat Rev Cancer 2011. **11**: 85-95.

Cammann C, Rath A, Reichl U, Lingel H, Brunner-Weinzierl M, Simeoni L, Schraven B and Lindquist JA "Early changes in the metabolic profile of activated CD8+ T cells." BMC Cell Biology 2016. **17**(28): 1-11.

Cao Y, Rathmell JC and Macintyre AN "Metabolic reprogramming towards aerobic glycolysis correlates with greater proliferative ability and resistance to metabolic inhibition in CD8 versus CD4 T cells." Plos One 2014. **9**(8): e104104.

Cara CJ, Pena AS, Sans M, Rodrigo L, Guerrero-Esteo M, Hinojosa J, García-Paredes J and Guijarro LG "Reviewing the mechanism of action of thiopurine drugs: towards a new paradigm in clinical practice." Med Sci Monit 2004. **10**(11): RA247-254.

Carreras-Planella L, Borràs FE and Franquesa M "Tolerance in kidney transplantation: what is on the B side?" Mediators Inflamm 2016. **2016**: 1-11.

CDU-HGE (2014). Les fondamentaux de la pathologie digestive. E. Masson**:** 1-13.

Chan CY, Zhao H, Pugh RJ and al e "Purinosome formation as a function of the cell cycle." Proc Natl Acad Sci U S A 2015. **112**(5): 1368-1373.

Chan DA and Giaccia AJ "PHD2 in tumour angiogenesis." Br J Cancer 2010. **103**: 1-5.

Chande N, Tsoulis D and MacDonald J "Azathioprine or 6-mercaptopurine for induction of remission in Crohn's disease." Cochrane Database Syst Rev 2013. **4**(CD000545).

Chang C-H and Pearce EL "Emerging concepts of T cell metabolism as a target of immunotherapy." Nat Immunol 2016. **17**(4): 364-368.

Chang C-H, Qiu J, O'Sullivan D, Buck MD, Noguchi T, Curtis JD, Chen Q, Gindin M, Gubin MM, Windt GJvd, Tonc E, Schreiber RD, Pearce EJ and Pearce EL "Metabolic competition in the tumor microenvironment is a driver of cancer progression." Cell 2015. **162**: 1229-1241.

Chaoul N, Fayolle C, Desrues B, Oberkampf M, Tang A, Ladant D and Leclerc C "Rapamycin impairs antitumor CD8+ T-cell responses and vaccine-induced tumor eradication." Cancer Res 2015. **75**(16): 3279-3291.

Chaundry V, Cornblath D, Griffin J, O'Brien R and Drachman D "Mycophenolate mofetil: a safe and promising immunosuppressant in neuromuscular diseases." Neurology 2001. **56**: 94-96.

Chen X, Xun K, Chen L and Wang Y "TNF-α, a potent lipid metabolism regulator." Cell Biochem Funct 2009. **27**: 407-416.

Chi H "Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions." Nat Rev Immunol 2012. **12**(5): 325-338.

Cho JH "The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease." Nat Rev Immunol 2008. **8**(6): 458-466.

Cho JH and Gregersen PK "Genomics and the multifactorial nature of human autoimmune disease." N Engl J Med 2011. **365**(17): 1612-1623.

Choi S-C, Titov AA, Sivakumar R, Li W and Morel L "Immune cell metabolism in systemic lupus erythematosus." Curr Rheumatol Rep 2016. **18**(66): 1-8.

Choi SJN, Lee HK, Kim NH and Chung SY "Mycophenolic acid mediated mitochondrial membrane potential transition change lead to T lymphocyte apoptosis." J Korean Surg Soc 2011. **81**: 235-241.

Chouchana L (2014). Optimisation de la réponse aux thiopurines par la pharmacogénétique: approches in vitro et cliniques, Université Paris Descartes.

Chouchana L, Narjoz C, Beaune P, Loriot M and Roblin X "Review article: the benefits of pharmacogenetics for improving thiopurine therapy in inflammatory bowel disease." Aliment Pharmacol Ther 2012. **35**: 15-36.

Choy E, Yelensky R, Bonakdar S, Plenge RM, Saxena R, Jager PLD, Shaw SY, Wolfish CS, Slavik JM, Cotsapas C, Rivas M, Dermitzakis ET, Cahir-McFarland E, Kieff E, Hafler D, Daly MJ and Altshuler D "Genetic analysis of human traits in vitro: drug response and gene expression in lymphoblastoid cell lines." PLoS Genet 2008. **4**(11): e1000287.

Clambey ET, McNamee EN, Westrich JA, Glover LE, Campbell EL, Jedlicka P, Zoeten EFd, Cambier JC, Stenmark KR, Colgan SP and Eltzschig HK "Hypoxia-inducible factor-1 alpha-dependent induction of FoxP3 drives regulatory T-cell abundance and function during inflammatory hpoxia of the mucosa." Proc Natl Acad Sci U S A 2012. **17**: 2784-2793.

Colombo D and Ammirati E "Cyclosporine in transplantation - a history of converging timelines." J Biol Regul Homeost Agents 2011. **25**(4): 493-504.

Commission E 2014. "Recent facts & figures on organ donation & transplantation." Retrieved 05/04/2017, from https://ec.europa.eu/health/blood_tissues_organs/events/journalist_workshops_organ_en#fragment0.

Connell W, Kamm M, Ritchie J and Lennard-Jones J "Bone marrow toxicity caused by azathioprine in inflammatory bowel disease: 27 years of experience." Gut 1993. **34**(8): 1081-1085.

Costenbader KH, Gay S, Alarcón-Riquelme ME, Iaccarino L and Doria A "Genes, epigenetic regulation and environmental factors: which is the most relevant in developing autoimmune diseases?" Autoimmunity Rev 2012. **11**: 604-609.

Coulthard S, Hogarth L, Little M, Matheson E, Redfern C, Minto L and Hall A "The effect of thiopurine methyltransferase activity and genotype in blasts from patients with acute leukemia." Blood 2002. **92**(8): 2856-2862.

Currie C, Poole C, Jenkins-Jones S, Gale E, Johnson J and Morgan C "Mortality after incident cancer in people with and without type 2 diabetes: impact of metformin on survival." Diabetes care 2012. **35**: 299-304.

D'Haens G, Baert F, Assche Gv, Caenepeel P, Vergauwe P, Tuynman H, Vos MD, Deventer Sv, Stitt L, Donner A, Vermeire S, Mierop FV, Coche J, Woude Jvd, Ochsenkühn T, Bodegraven Av, Hootegem PV, Lambrecht G, Mana F, Rutgeerts P, Feagan B, Hommes D, Group BIBDR and Club N-HG "Early combined immunosuppression or conventional management in patients with newly diagnosed Crohn's disease: an open randomised trial." Lancet 2008. **371**(9613): 23-29.

Dang EV, Barbi J, Yang HY, Jinasena D, Yu H, Zheng Y, Bordman Z, Fu J, Kim Y, Yen HR, Luo W, Zeller K, Shimoda L, Topalian SL, Semenza GL, Dang CV, Pardoll DM and Pan F "Control of TH17/Treg balance by hypoxia-inducible factor 1." Cell Metab 2011. **146**: 772-784.

Daye D and Wellen KE "Metabolic reprogramming in cancer: unraveling the role of glutamine in tumorigenesis." Semin Cell Dev Biol 2012. **23**: 362-369.

DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G and Thompson CB "The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation." Cell Metab 2008. **7**: 11-20.

Decensi A, Putoni M, Goodwin P, Cazzaniga M, Gennari A, Bonanni B and Gandini S "Metformin and cancer risk in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis." Cancer Prev Res (Phila) 2010. **3**(11): 1451-1461.

Dervieux T, Blanco J, Krynetski E, Vanin E, Roussel M and Relling M "Differing contribution of thiopurine methyltransferase to mercaptopurine versus thioguanine effects in human leukemic cells." Cancer Res 2001. **61**(15): 5810-5816.

Diaz O, Mébarek-Azzam S, Benzaria A, Dubois M, Lagarde M, Némoz G and Prigent A-F "Disruption of lipid rafts stimulates phospholipase D activity in human lymphocytes: implication in the regulation of immune function." J Immunol 2005. **175**: 8077-8086.

Dignass A, Assche GV, Lindsay J, Lémann M, Söderholm J, Colombel J, Danese S, D'Hoore A, Gassull M, Gomollón F, Hommes D, Michetti P, O'Morain C, Öresland T, Windsor A, Stange E and Travis S "The second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management." J Crohns Colitis 2010. **4**: 28-62.

Domhan S, Muschal S, Schwager C, Morath C, Wirkner U, Ansorge W, Maercker C, Zeier M, Huber PE and Abdollahi A "Molecular mechanisms of the antiangiogenic and antitumor effects of mycophenolic acid." Mol Cancer Ther 2008. **7**(6): 1656-1668.

Donnelly RP and Finlay DK "Glucose, glycolysis and lymphocyte responses." Mol Immunol 2015. **68**(2): 513-519.

Dumont FJ and Su Q "Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin." Life Sciences 1996. **58**(5): 373-395.

Dun B, Sharma A, Xu H, Liu H, Bai S, Zeng L and She J-X "Transcriptomic changes induced by mycophenolic acid in gastric cancer cells." Am J Transl Res 2014. **6**(1): 28-42.

Dun B, Xu H, Sharma A, Liu H, Yu H, Yi B, Liu X, He M, Zeng L and She J-X "Delineation of biological and molecular mechanisms underlying the diverse anticancer activities of mycophenolic acid." Int J Clin Exp Pathol 2013. **6**(12): 2880-2886.

Eastaff-Leung N, Mabarrack N, Barbour A, Cummins A and Barry S "Foxp3+ regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease." J Clin Immunol 2010. **30**: 80-89.

EDQM "International figures on donation and transplantation 2014." Newsletter Transplant 2015. **20**: 1-68.

Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA and Mauri C "Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFa therapy." J Exp Med 2004. **200**(3): 277-285.

Eklund B and Mannervik B "Importance of a hypervariable active-site residue in human Mu class glutathione transferases catalyzing the bioactivation of chemotherapeutic thiopurine prodrugs." Biochim Biophys Acta 2007. **1770**(8): 1098-1103.

Eklund B, Moberg M, Bergquist J and Mannervik B "Divergent activities of human glutathione transferases in the bioactivation of azathioprine." Mol Pharmacol 2006. **70**(2): 747-754.

Elion GB "Symposium on immunosuppressive drugs. Biochemistry and pharmacology of purine analogues." Fed Proc 1967. **26**(3): 898-904.

Elion GB "Significance of azathioprine metabolites." Proc R Soc Med 1972. **65**(3): 257-260.

Elion GB "The purine path to chempotherapy." Science 1989. **244**: 41-47.

Eltzschig HK and Carmeliet P "Hypoxia and inflammation." N Engl J Med 2011. **364**: 656-665.

EMA 2015a. "Base de données publique des médicaments- Cellcept ". Retrieved 21/04/2017, from http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2015/20151127133460/anx_133460_fr.pdf.

EMA 2015b. "Résumé des caracteristiques du produit: Rapamune (sirolimus)." Retrieved 08/05/2017, from http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2015/20151127133597/anx_133597_fr.pdf.

EMA 2016. "Résumé des caractéristiques du produit: Afinitor (everolimus)." Retrieved 08/05/2017, from http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2016/20160526135037/anx_135037_fr.pdf.

Evans WE, Hon YY, Bomgaars L, Coutre S, Holdsworth M, Janco R, Kalwinsky D, keller F, Khatib Z, Margolin J, Murray J, Quinn J, Ravidranath Y, Ritchey K, Roberts W, Rogers ZR, Schiff D, Steuber C, Tucci F, Kornegay N, Krynetski EY and Relling MV "Preponderance of thiopurine S-Methyltransferase deficiency and heterozygosity among patients intolerant to mercaptopurine or azathioprine." J Clin Oncol 2001. **19**(8): 2293-2301.

Falk M, Ussat S, Reilling N, Wesch D, Kabelitz D and Adam-Klages S "Caspase inhibition blocks human T cell proliferation by suppressing appropiate regulation of IL-2, CD25, and cell cycle-associated proteins." J Immunol 2004. **173**: 5077-5085.

Fassbinder T, Saunders U, Mickholz E, Jung E, Becker H, Schlüter B and Jacobi AM "Differential effects of cyclophosphamide and mycophenolate mofetil on cellular and serological parameters in patients with systemic lupus erythematosus." Arthritis Res Ther 2015. **17**(92).

Faubert B, Boily G, Izreig S, Griss T, Samborska B, Dong Z, Dupuy F, Chambers C, Fuerth BJ, Viollet B, Mamer OA, Avizonis D, DeBerardinis RJ, Siegel PM and Jones RG "AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth in vivo." Cell Metab 2013. **17**: 113-124.

Feagan B and Macdonald J "Oral 5-aminosalicylic acid for induction of remission in ulcerative colitis." Cochrane Database Syst Rev 2012. **10**(CD000543).

Feldmann M and Steinman L "Design of effective immunotherapy for human autoimmunity." Nature 2005. **435**: 612-619.

Fernández-Ramos AA, Poindessous V, Marchetti-Laurent C, Pallet N and Loriot M-A "The effect of immunosuppressive molecules on T-cell metabolic reprogramming." Biochimie 2016. **127**: 23-36.

Flahault A, Anglicheau D, Loriot M-A, Thervet E and Pallet N "Clinical impact of the CYP3A5 6986A>G allelic variant on kidney transplantation outcomes." Pharmacogenomics 2017. **18**(2): 165-173.

Fong SCM, Blaker PA, Arenas-Hernandez M, Marinaki AM and Sanderson JD "Getting the best out of thiopurine therapy: thiopurine S-methyltransferase and beyond." Biomark Med 2015. **9**(1): 51-65.

Fontenot JD, Gavin MA and Rudensky AY "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." Nat Immunol 2003. **4**(4): 330-336.

Fotoohi AK, Lindqvist M, Peterson C and Albertioni F "Involvement of the concentrative nucleoside transporter 3 and equilibrative nucleoside transporter 2 in the resistance of T-lymphoblastic cell lines to thiopurines." Biochem Biophys Res Commun 2006. **343**(1): 208-215.

Fraser A, Orchard T and Jewll D "The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review." Gut 2002. **50**(4): 485-489.

Freemerman AJ, Johnson AR, Sacks GN, Milner JJ, Kirk EL, Troester MA, Macintyre AN, Goraksha-Hicks P, Rathmell JC and Makowski L "Metabolic reprogramming of macrophages. Glucose transporter 1 (Glut1)-mediated glucose metabolism drives a proinflammatory phenotype." J Biol Chem 2014. **289**(11): 7884-7896.

Fridley BL, Batzler A, Li L, Li F, Matimba A, Jenkins GD, Ji Y, Wang L and Weinshilbourn RM "Gene set analysis of purine and pyrimidine antimetabolites cancer therapies." Pharmacogenet Genomics 2011. **21**(11): 701-712.

Fuhrmann A, Lopes P, Sereno J, Pedro J, Espinoza D, Pereira M, Reis F, Eriksson J and Carvalho E "Molecular mechanisms underlying the effects of cyclosporin A and sirolimus on glucose and lipid metabolism in liver, skeletal muscle and adipose tissue in an in vivo rat model." Biochem Pharmacol 2014. **88**: 216-228.

Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T and Fujiyama Y "Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease." Gut 2003. **52**: 65-70.

Galluzzi L, Kepp O, Heiden MGV and Kroemer G "Metabolic targets for cancer therapy." Nat Rev Drug Discov 2013. **12**: 829-946.

Gatenby RA and Gillies RJ "Why do cancers have high aerobic glycolysis?" Nat Rev Cancer 2004. **4**: 891-899.

Giverhaug T, Loennechen T and Aarbakke J "The interaction of 6-mercaptopurine (6-MP) and methotrexate (MTX)." Gen Pharmacol 1999. **33**: 341-346.

Goodnow CC, Sprent J, Groth BFdS and Vinuesa CG "Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity." Nature 2005. **435**: 590-597.

Green DR, Galluzzi L and Kroemer G "Metabolic control of cell death." Science 2014. **345**(6203): 1250256.

Greene TA "Genetic analysis of CD28 signaling." Immunol Res 2003. **27**(2-3): 513-520.

Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP and Ley TJ "Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death." Immunity 2004. **21**: 589-601.

Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE and Shaw RJ "AMPK phosphorylation of Raptor mediates metabolic checkpoint." Mol Cell 2008. **30**: 214-226.

Halloran PF "Immunosuppressive drugs for kidney transplantation." N Engl J Med 2004. **351**(26): 2715-2729.

Hanauer SB "Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities." Inflamm Bowel Dis 2006. **12**(Supplement 1): S3-S9.

Hartman S and Buchanan J "Nucleic acids, purines, pyrimidines (nucleotide synthesis)." Ann Rev Biochem 1959. **28**: 365-410.

Hartono C, Muthukumar T and Suthanthiran M "Immunosuppressive drug therapy." Cold Spring Harb Perspect Med 2013. **3**: 1-15.

He X, Smeets R, Koenen H, Vink P, Wagenaars J, Boots A and Joosten I "Mycophenolic acid-mediated suppression of human CD4+ T cells: more than mere guanine nucleotide deprivation." Am J Transplant 2011. **11**: 439-449.

Heiden MGV "Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens." Nat Rev Drug Discov 2011. **10**(671-684).

Hindorf U, Lindqvist M, Hildebrand H, Fagerberg U and Almer S "Adverse events leading to modification of therapy in a large cohort of patients with inflammatory bowel disease." Aliment Pharmacol Ther 2006. **24**(2): 331-342.

Hirsch DL and Ponda P "Antigen-based immunotherapy for autoimmune disease: current status." Immunotargets Ther 2015. **4**: 1-11.

Ho P-C, Bihuniak JD, Macintyre AN, Staron M, Liu X, Amezquita R, Tsui Y-C, Cui G, Micevic G, Perales JC, Kleinstein SH, Abel ED, Insogna KL, Feske S, Locasale JW, Bosenberg MW, Rathmell JC and Kaech SM "Phosphoenolpyruvate is a metabolic checkpoint of anti-tumor T cell responses." Cell 2015. **162**: 1217-1228.

Hogquist KA, Baldwin TA and Jameson SC "Central tolerance: learning self-control in the thymus." Nat Rev Immunol 2005. **5**: 772-782.

Hsieh AL, Walton ZE, Altman BJ, Stine ZE and Dang CV "Myc and metabolism on the path to cancer." Semin Cell Dev Biol 2015. **43**: 11-21.

Hu M, Wang YM, Wang Y, Zhang GY, Zheng G, Yi S, O'Connell PJ, Harris DC and Alexander SI "Regulatory T cells in kidney disease and transplantation." Kidney Int 2016. **90**: 502-514.

Huang H-Y, Chang H-F, Tsai M-J, Chen J-S and Wang M-J "6-mercaptopurine attenuates tumor necrosis factor-α production in microglia through Nur77-mediated transrepression and PI3K/Akt/mTOR signaling-mediated translational regulation." J Neuroinflamm 2016. **13**(78): 1-20.

Huang RS, Duan S, Bleibel WK, Kristner EO, Zhang W, Clark TA, Chen TX, Schweitzer AC, Blume JE, Cox NJ and Dolan ME "A genome-wide approach to identify genetic variants that contribute to etoposide-induced cytotoxicity." Proc Natl Acad Sci U S A 2007. **104**(23): 9758-9763.

Hugot J-P, Zaccaria I, Cavanaugh J, Yang H, Vermeire S, Lappalainen M, Schreiber S, Annese V, Jewell DP, Fowler EV, Brant SR, Silverberg MS, Cho J, Rioux JD, Satsangi J and Parkes M "Prevalence of CARD15/NOD2 mutations in Caucasian healthy people." An J Gastroenterol 2007. **102**(6): 1259-1267.

Hulleman E, Kazemier KM, Holleman A, VanderWeele DJ, Rudin CM, Broekhuis MJ, Evans WE, Pieters R and Boer MLD "Inhibition of glycolysis modulates prednisolone resistance in acute lymphoblastic leukemia cells." Blood 2009. **113**(9): 2014-2021.

Hyslop R and Jardine I "Metabolism of 6-thiopurines. II. Covalent binding of a 6-thiopurine metabolite to mammalian tissue protein in vivo." J Pharmacol Exp Ther 1981. **218**(3): 629-635.

Illsinger S, Göken C, Brockmann M, Thiemann I, Bednarczyk J, Schmidt K-H, Lücke T, Hoy L, Janzen N and Das AM "Effect of tacrolimus on energy metabolism in human umbilical endothelial cells." Ann Transplant 2011a. **16**(2): 68-75.

Illsinger S, Janzen N, Lücke T, Bednarczyk J, Schmidt K, Hoy L, Sander J and Das A "Cyclosporine A: impact on mitochondrial function in endothelial cells." Clin Transplant 2011b. **25**: 584-593.

Inaba H, Greaves M and Mullighan CG "Acute lymphoblastic leukaemia." Lancet 2013. **381**: 1943-1955.

Inoki K, Kim J and Guan KL "AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets." Annu Rev Pharmacol Toxicol 2012. **52**: 381-400.

Invernizzi P and Gershwin ME "The genetics of human autoimmune disease." J Autoimmun 2009. **33**: 290-299.

Iurlaro R, León-Annicchiarico CL and Muñoz-Pinedo C "Regulation of cancer metabolism by oncogenes and tumor suppressors." Methods Enzymol 2014. **542**: 59-80.

Jiang B-H and Liu L-Z "Role of mTOR in anticancer drug resistance: perspectives for improved drug treatment." Drug Resist Uptdat 2008. **11**: 63-76.

Jiang P, Du W and Wu M "Regulation of the pentose phosphate pathway in cancer." Protein Cell 2014. **5**(8): 592-602.

Jiang S and Yan W "T-cell immunometabolism against cancer." Cancer Lett 2016. **382**: 255-258.

Jonge Hd and Kuypers DR "Pharmacogenetics in solid organ transplantation: current status and future directions." Transplant Rev (Orlando) 2008. **22**: 6-20.

Jonge Hd, Metalidis C, Naesens M, Lambrechts D and Kuypers DR "The P450 oxidoreductase *28 SNP is associated with low initial tacrolimus exposure and increased dose requirements in CYP3A5-expressing renal recipients." Pharmacogenomics 2011. **12**(9): 1281-1291.

Kaistha A and Levine J "Inflammatory bowel disease: the classic gastrointestinal autoimmune disease." Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care 2014. **44**: 328-334.

Karran P and Attard N "Thiopurines in current medical pratice: molecular mechanisms and contributions to therapy-related cancer." Nat Rev Cancer 2008. **8**: 24-36.

Kato H and Perl A "Mechanistic target of rapamycin complex 1 expands Th17 and IL4+ CD4-CD8- double-negative T cells and contracts regulatory T cells in systemic lupus erythematosus." J Immunol 2014. **192**: 4134-1144.

Kawai T and Cosimi AB "Induction of tolerance in clinical kidney transplantation." Clin Transplant 2010. **24**(Suppl 22): 2-5.

Ke Q and Costa M "Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)." Mol Pharmacol 2006. **70**(5): 1469-1480.

Khan A, Nasr P, El-Charataby E and El-Sayegh S "An insight into the immunologic events and risk assessment in renal transplantation." J Clin Med Res 2016. **8**(5): 367-372.

Khan S and Sewell WC "Oral immunosuppressive drugs." Clin Med 2006. **6**: 352-355.

Kho M, Cransberg K, Weimar W and Gelder Tv "Current immunosuppressive treatment after kidney transplantation." Expert Opin Pharmacother 2011. **12**(8): 1217-1231.

Khor B, Gardet A and Xavier RJ "Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease." Nature 2011. **474**: 307-317.

Kindt TJ, Goldsby RA and Osborne BA (2007a). Tolerance and autoimmunity. Kuby Immunology 401-424.

Kindt TJ, Goldsby RA and Osborne BA (2007b). Transplantation Immunology. Kuby Immunology**:** 425-446.

Kirchner GI, Meier-Wiedenbach I and Manns MP "Clinical pharmacokinetics of everolimus." Clin Pharmacokinet 2004. **43**(2): 83-95.

Kirschner B "Safety of azathioprine and 6-mercaptopurine in pediatric patients with inflammatory bowel disease." Gastroenterol 1998. **115**(4): 813-821.

Knoll G and Bell R "Tacrolimus versus cyclosporin for immunosuppression in renal transplantation: meta-analysis of randomised trials." Br Med J 1999. **318**: 1104-1107.

Kondo M, Yamaoka T, Honda S, Miwa Y, Katashima R, Moritani M, Yoshimoto K, Hayashi Y and Itakura M "The rate of cell growth is regulated by purine biosynthesis via ATP production and G1 to S phase transition." J Biochem 2000. **128**: 57-64.

Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Saito S, Inoue K, Kamatani N, Gillespie MT, Martin TJ and Suda T "IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis." J Clin Invest 1999. **103**: 1345-1352.

Kurowski V and Iven H "Plasma concentrations and organ distribution of thiopurines after oral application of azathioprine in mice." Cancer Chemother Pharmacol 1991. **28**(1): 7-14.

Kurtovic S, Grehn L, Karlsson A, Hellman U and Mannervik B "Glutathione transferase activity with a novel substrate mimics the activation of the prodrug azathioprine." Anal Biochem 2008. **375**(2): 339-344.

Laliberté J, Yee A, Xiong Y and Mitchell BS "Effects of guanine nucleotide depletion on cell cycle progression in human T lymphocytes." Blood 1998. **91**(8): 2896-2904.

Lebranchu Y, Baan C, Biancone L, Legendre C, Morales JM, Naesens M, Thomusch O and Friend P "Pretransplant identification of acute rejection risk following kidney transplantation." Transpl Int 2013. **27**: 129-138.

Ledderose C, Bao Y, Lidicky M, Zipperle J, Li L, Strasser K, Shapiro NI and Junger WG "Mitochondria are gate-keepers of T cell function by producing the ATP that drives purinergic signaling." J Biol Chem 2014. **189**(37): 25936-25945.

Lee C-F, Lo Y-C, Cheng C-H, Furtmüller GJ, Oh B, Andrade-Oliveira V, Thomas AG, Bowman CE, Slusher BS, Wolfgang MJ, Brandacher G and Powell JD "Preventing allograft rejection by targeting immune metabolism." Cell Rep 2015. **13**(4): 760-770.

Legendre C, Loupy A, Rabant M, Aubert O, Rabaté C, Delville M, Tinel C, Amrouche L, Martinez F, Snanoudj R, Bererhi L, Scemla A, Sberro-Soussan R, Duong J-P, Suberbielle C and Anglicheau D "Aspects actuels des rejets aigus humoraux." Nephrol Ther 2014. **10**: 479-483.

Legendre C, Zuber J, Anglicheau D, Quintrec ML, Martinez F, Mamzer-Bruneel M-F and Thervet E "Immunosuppression in kidney transplantation (Immunosuppression en transplantation rénale)." Ann Urol 2007. **41**: 276-284.

Lennard L, Lilleyman J, Loon JV and Weinshilboum R "Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia." Lancet 1990. **336**(8709): 225-229.

Levine JS and Burakoff R "Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease." Gastroenterol Hepatol 2011. **7**(4): 235-241.

Li J, Kim SG and Blenis J "Rapamycin: one drug, many effects." Cell Metab 2014. **19**: 373-379.

Li L, Fridley B, Kalari K, Jenkins G, Batzier A, Safgren S, Hildebrandt M, Ames M, Schaid D and Wang L "Gemcitabine and cytosine arabinoside cytotoxicity: association with lymphoblastoid cell expression." Cancer Res 2008. **68**(17): 7050-7058.

Li Y, Shen C, Zhu B, Shi F, Elisen HN and Chen J "Persistent antigen and prolonged AKT-mTORC1 activation underlie memory CD8 T cell impairment in the absence of CD4 T cells." J Immunol 2015. **195**(4): 1591-1598.

Lim MA, Kohli J and Bloom RD "Immunosuppression for kidney transplantation: where are we now and where are we going?" Transplant Rev (Orlando) 2017. **31**: 10-17.

Lin S, McLennan A, Ying K, Wang Z, Gu S, Jin H, Wu C, Liu W, Yuan Y, Tang R, Xie Y and Mao Y "Cloning, expression, and characterization of a human inosine triphosphate pyrophosphatase encoded by the itpa gene." J Biol Chem 2001. **276**(22): 18695-18701.

Lin Z, Fillmore GC, Um T-H, Elenitoba-Johnson KS and Lim MS "Comparative microarray analysis of gene expression during activation of human peripheral blood T cells and leukemic Jurkat T cells." Lab Invest 2003. **83**(6): 765-776.

Liu YV, Hubbi ME, Pan F, McDonald KR, Mansharamani M, Cole RN, Liu JO and Semenza GL "Calcineurin promotes hypoxia-inducible factor 1a expression by dephosphorylating RACK1 and blocking RACK1 dimerization." J Biol Chem 2007. **282**(51): 37064-37073.

Loftus EV "Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences." Gastroenterol 2004. **126**: 1504-1517.

Loftus RM and Finlay DK "Immunometabolism: cellular metabolism turns immune regulator." J Biol Chem 2016. **291**(1): 1-10.

Lu C-L, Qin L, Liu H-C, Candas D, Fan M and Li JJ "Tumor cells switch to mitochondrial oxidative phosphorylation under radiation via mTOR-mediated hexokinase II inhibition - a Warburg-reversing effect." Plos One 2015. 1-20.

Lu J and Zhang X "Immunological characteristics of renal transplant tolerance in humans." Mol Immunol 2016. **77**: 71-78.

Macintyre AN, Gerriets VA, Nichols AG, Michalek RD, Rudolph MC, Deoliveira D, Anderson SM, Abel ED, Chen BJ, Hale LP and Rathmell JC "The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function." Cell Metab 2014. **20**(1): 61-72.

Macintyre AN and Rathmell JC "Activated lymphocytes as a metabolic model for carcinogenesis." Cancer Metab 2013. **1**(5): 1-12.

Maciolek JA, Pasternak JA and Wilson HL "Metabolism of activated T lymphocytes." Curr Opin Immunol 2014. **27**: 60-74.

MacIver NJ, Michalek RD and Rathmell JC "Metabolic regulation of T lymphocytes." Annu Rev Immunol 2013. **31**: 259-283.

Mahalati K and Kahan BD "Clinical pharmacokinetics of sirolimus." Clin Pharmacokinet 2001. **40**(8): 573-585.

Majmundar A, Wong W and Simon M "Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress." Mol Cell 2010. **40**(2): 294-309.

Marchesi S and Sartorelli A "The biochemical basis for the differential sensitivity of intestinal mucosa and bone marrow to 6-thioguanine." Cancer Res 1963. **23**: 1769-1773.

Marini C, Salani B, Massollo M, Amaro A, Esposito AI, Orengo AM, Capitanio S, Emionite L, Riondato M, Bottoni G, Massara C, Boccardo S, Fabbi M, Campi C, Ravera S, Angelini G, Morbelli S, Cilli M, Cordera R, Truini M, Maggi D, Pfeffer U and Sambuceti G "Direct inhibition of hexokinase activity by metformin at least partially impairs glucose metabolism and tumor growth in experimental breast cancer." Cell Cycle 2013. **12**(22): 3490-3499.

Maripuri S and Kasiske BL "The role of mycophenolate mofetil in kidney transplantation revisited." Transplant Rev (Orlando) 2014. **28**(1): 26-31.

Marrack P, Kappler J and Kotzin BL "Autoimmune disease: why and where it occurs." Nat Med 2001. **7**(8): 899-905.

Mason EF, Zhao Y, Goraksha-Hicks P, Coloff JL, Gannon H, Jones SN and Rathmell JC "Aerobic glycolysis suppresses p53 activity to provide selective protection from apoptosis upon loss of growth signals or inhibition of BCR-Abl." Cancer Res 2010. **70**(20): 8066-8076.

Matricon J "Immunopathogenèse des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin." Med Sci 2010. **26**: 405-410.

McGonagle D and McDermott MF "A proposed classification of the immunological diseases." PLoS Medicine 2006. **3**(8): 1242-1248.

Mehta MM and Chandel NS "Targeting metabolism for lupus therapy." Sci Transl Med 2015. **7**(274fs5): 1-2.

Mei L, Ontiveros EP, Griffiths EA, Thompson JE, Wang ES and Wetzler M "Pharmacogenetics predictive of response and toxicity in acute lymphoblastic leukemia therapy." Blood Rev 2015. **29**: 243-249.

Metalidis C, Lerut E, Naesens M and Kuypers DR "Expression of CYP3A5 and P-glycoprotein in renal allografts with histological signs of calcineurin inhibitor nephrotoxicity." Transplantation 2011. **91**(10): 1098-1102.

Michalek RD, Gerriets VA, Jacobs SR, Macintyre AN, MacIver NJ, Mason EF, Sullivan SA, Nichols AG and Rathmell JC "Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4+ T cell subsets." J Immunol 2011. **186**: 3299-3303.

Miyara M, Amoura Z, Parizot C, Badoual C, Dorgham K, Trad S, Nochy D, Debré P, Piette J-C and Gorochov G "Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus." J Immunol 2005. **175**: 8392-8400.

Mockler MB, Conroy MJ and Lysaght J "Targeting T cell immunometabolism for cancer immunotherapy; understanding the impact of the tumor microenvironment." Front Immunol 2014. **4**(107): 1-11.

Moes DJA, Guchelaar H-J and Fijter JWd "Sirolimus and everolimus in kidney transplantation." Drug Discov Today 2015. **20**(10): 1243-1249.

Mognol GP, Araujo-Souza PSd, Robbs BK, Teixera LK and Viola JP "Transcriptional regulation of the c-myc promoter NFAT1 involvers negative and positive NFAT-responsive elements." Cell Cycle 2012. **11**(5): 1014-1028.

Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW and Kaplan GG "Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review." Gastroenterol 2012. **142**(46-54).

Moon W and Loftus E "Review article: recent advances in pharmacogenetics and pharmacokinetics for safe and efective thiopurine therapy in inflammatory bowel disease." Aliment Pharmacol Ther 2016. **43**: 863-883.

Morag A, Kirchheiner J, Rehavi M and Gurwitz D "Human lymphoblastoid cell line panels: novel tools for assessing shared drug pathways." Pharmacogenomics 2010. **11**(3): 327-340.

Morath C, Arns W, Schwenger V, Mehrabi A, Fonouni H, Schmidt J and Zeier M "Sirolimus in renal transplantation." Nephrol Dial Transplant 2007. **22**(Suppl 8): viii61-viii65.

Morel L "Immunometabolism in systemic lupus erythematosus." Nat Rev Rheumatol 2017. **13**: 280-290.

Moriyama T, Nishii R, Perez-Andreu V, Yang W, Klussmann F-A, Zhao X, Lin T-N, Hoshitsuki K, Nersting J, Kihira K and Hofmann U "NUDT15 polymorphisms alter thiopurine metabolism and hematopoietic toxicity." Nat Genet 2016. **48**: 367-373.

Morrish F and Hockenbery D "MYC and mitochondrial biogenesis." Cold Spring Harb Perspect Med 2014. **4**(a014225): 1-16.

Murch S, Braegger C, Walker-Smith J and MacDonald T "Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease." Gut 1993. **34**(12): 1705-1709.

Naesens M, Kuypers DR and Sarwal M "Calcineurin inhibitor nephrotoxicity." Clin J Am Soc Nephrol 2009. **4**: 481-508.

Naesens M and Sarwal MM "Harnessing the diversity of the human T-cell repertoire: a monitoring tool for transplantation tolerance?" Eur J Immunol 2010a. **40**: 2986-2989.

Naesens M and Sarwal MM "Monitoring calcineurin inhibitor therapy: localizing the moving target." Transplantation 2010b. **89**(11): 1308-1309.

Neurath MF "Cytokines in inflammatory bowel disease." Nat Rev Immunol 2014. **14**: 329-342.

Nizet V and Johnson RS "Interdependence of hypoxic and innate immune responses." Nat Rev Immunol 2009. **9**: 609-617.

Nobelprize.org 2014. "Gertrude B. Elion - Facts." Retrieved January 17, 2017, from http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1988/elion-facts.html.

O'Sullivan D and Pearce EL "Targeting T cell metabolism for therapy." Trends Immunol 2015. **36**: 71-80.

O'Sullivan D, van der Windt GJ, Huang SC, Curtis JD, Chang CH, Buck MD, Qiu J, Smith AM, Lam WY, DiPlato LM, Hsu FF, Birnbaum MJ, Pearce EJ and Pearce EL "Memory CD8(+) T cells use cell-intrinsic lipolysis to support the metabolic programming necessary for development." Immunity 2014. **41**(1): 75-88.

Oliveira RLd, Deschoemaeker S, Henze A, Debackere K, Finisguerrq V, Takeda Y, Roncal C, Dettori D, Tack E, Jönsson Y, Veschini L, Peeters A, Anisimov A, Hofmann M, Alitalo K, Baes M, D'hooge J, Carmeliet P and Mazzone M "Gene-targeting of Phd2 improves tumor response to chemotherapy and prevents side-toxicity." Cancer Cell 2012. **22**(2): 263-277.

Ordentlich P, Yan Y, Zhou S and Heyman RA "Identification of the antineoplastic agent 6-mercaptopurine as an activator of the orphan nuclear hormone receptor Nurr1." J Biol Chem 2003. **278**(27): 24791-24799.

Otterness D, Szumlanski C, Lennard L, Klemetsdal B, Aarbakke J, Park-Hah J, Iven H, Schmiegelow K, Branum E, O'Brien J and Weinshilboum R "Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: gene sequence polymorphisms." Clin Pharmacol Ther 1997. **62**(1): 60-73.

Pallet N, Beaune P, Legendre C and Anglicheau D "Rapamycine et inhibition de mTOR: des voies de signalisation aux applications cliniques." Ann Biol Clin 2006. **64**(2): 107-115.

Pallet N and Thervet E "The genetics of kidney transplantation." Hum Genet 2012. **131**: 317-323.

Palmer CS, Hussain T, Duette G, Weller TJ, Ostrowski M, Sada-Ovalle I and Crowe SM "Regulators of glucose metabolism in CD4+ and CD8+ T cells." Int Rev Immunol 2016. **35**(6): 477-488.

Palmer CS, Ostrowski M, Balderson B, Christian N and Crowe SM "Glucose metabolism regulates T cell activation, differenciation, and functions." Front Immunol 2015. **61**(1-6).

Palsson-McDermott EM and O'Neill LA "The Warburg effect then and now: from cancer to inflammatory diseases." Bioessays 2013. **35**(11): 965-973.

Park HG, Yi H, Kim SH, Yu HS, Ahn YM, Lee YH, Roh M-S and Kim YS "The effect of cyclosporine A on the phosphorylation of the AMPK pathway in the rat hippocampus." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2011. **35**: 1933-1937.

Parkin J and Cohen B "An overview of the immune system." Lancet 2001. **357**: 1777-1789.

Parmentier-Decrucq E, Duhamel A, Ernst O, Fermont C, Louvet A, Vernier-Massouille G, Cortot A, Colombel J, Desreumaux P and Peyrin-Biroulet L "Effects of infliximab therapy on abdominal fat and metabolic profile in patients with Crohn's disease." Inflamm Bowel Dis 2009. **15**(10): 1476-1484.

Patel CH and Powell JD "Targeting T cell metabolism to regulate T cells activation, differentiation and function in disease." Curr Opin Immunol 2017. **46**(82-88).

Patel JK and Kobashigawa JA "Everolimus: an immunosuppressive agent in transplantation." Expert Opin Pharmacother 2006. **7**(10): 1347-1355.

Patsoukis N, Bardhan K, Chatterjee P, Sari D, Liu B, Bell LN, Karoly ED, Freeman GJ, Petkova V, Seth P, Li L and Boussiotis VA "PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation." Nat Commun 2015. **6**: 6692.

Pearce EL "Metabolism in T cell activation and differentiation." Curr Opin Immunol 2010. **22**(3): 314-320.

Pearce EL and Pearce EJ "Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence." Immunity 2013. **38**(4): 633-643.

Pearce EL, Poffenberger MC, Chang CH and Jones RG "Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function." Science 2013. **342**(6155): 1242454.

Pelanda R and Torres RM "Central B-Cell tolerance: where selection begins." Cold Spring Harb Perspect Biol 2012. **4**: 1-15.

Peng X, Shi Z, Damaraju V, Huang X, Kruh G, Wu H, Zhou Y, Tiwari A, Fu L, Cass C and Chen Z "Up-regulation of MRP4 and down-regulation of influx transporters in human leukemic cells with acquired resistance to 6-mercaptopurine." Leuk Res 2008. **32**(5): 799-809.

Pereira MJ, Palming J, Rizell M, Aureliano M, Carvalho E, Svensson MK and Eriksson JW "Cyclosporine A and Tacrolimus reduce the amount of GLUT4 at the cell surface in human adipocytes: increased endocytosis as a potential mechanism for the diabetogenic effects of immunosuppressive agents." J Clin Endocrinol Metab 2014. **99**(10): E1885-1894.

Perl A "Activation of mTOR (mechanistic target of rapamycin) in rheumatic diseases." Nat Rev Rheumatol 2016. **12**: 169-182.

Phan LM, Yeung SCJ and Lee MH "Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies." Cancer Biol Med 2014. **11**: 1-19.

Plomgaard P, Fischer C, Ibfelt T, Pedersen B and Hall Gv "Tumor necrosis factor-alpha modulates human in vivo lipolysis." J Clin Endocrinol Metab 2008. **93**: 543-549.

Pollizzi KN, Patel CH, Sun I-H, Oh M-H, Waickamn AT, Wen J, Delgoffe GM and Powell JD "mTORC1 and mTORC2 selectively regulate CD8+ T cell differentiation." J Clin Invest 2015. **125**(5): 2090-2108.

Pollizzi KN and Powell JD "Integrating canonical and metabolic signalling programmes in the regulation of T cell responses." Nat Rev Immunol 2014. **14**(7): 435-446.

Porceddu M, Buron N, Roussel C, Labbe G, Fromenty B and Borgne-Sanchez A "Prediction of liver injury induced by chemicals in human with a multiparametric assay on isolated mouse liver mitochondria." Toxicol Sci 2012. **129**(2): 332-345.

Porporato PE, Dhup S, Dadhich RK, Copetti T and Sonvenaux P "Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review." Front Pharmacol 2011. **2**(49): 1-18.

Pouché L, Stojanova J, Marquet P and Picard N "New challenges and promises in solid organ transplantation pharmacogenetics: the genetic variability of proteins involved in the pharmacodynamics of immunosuppressive drugs." Pharmacogenomics 2016. **17**(3): 277-296.

Powell JD and Delgoffe GM "The mammalian target of rapamycin: linking T cell differentiation, function, and metabolism." Immunity Rev 2010. **33**: 301-311.

Pozuelo-Rubio M "14-3-3 proteins are regulators of autophagy." Cells 2012. **1**(4): 754-773.

Pratschke J, Dragun D, Hauser IA, Horn S, Mueller TF, Schemmer P and Thaiss F "Immunological risk assessment: The key to individualized immunosuppression after kidney transplantation." Transplant Rev (Orlando) 2016. **30**: 77-84.

Present D, Meltzer S, Krumholz M, Wolke A and Korelitz B "6-mercaptopurine in the management of inflammatory bowel disease: short- and long-term toxicity." Ann Intern Med 1989. **111**(8): 641-649.

Pui C-H and Evans WE "Treatment of acute lymphoblastic leukemia." N Engl J Med 2006. **354**(2): 166-178.

Quéméneur L, Flacher M, Gerland LM, Ffrench M, Revillard JP and Bonnefoy-Berard N "Mycophenolic Acid Inhibits IL-2-Dependent T Cell Proliferation, But Not IL-2-Dependent Survival and Sensitization to Apoptosis." J Immunol 2002. **169**(5): 2747-2755.

Quéméneur L, Gerland L, Flacher M, Ffrench M, Revillard J and Genestier L "Differential control of cell cycle, proliferation, and survival of primary T lymphocytes by purine and pyrimidine nucleotides." J Immunol 2003. **170**(10): 4986-4995.

Racker E "History of the Pasteur effect and its pathobiology." Mol Cell Biochem 1974. **5**: 17-23.

Radu RG, Fujimoto S, Mukai E, Takehiro M, Shimono D, Nabe K, Shimodahira M, Kominato R, Aramaki Y, Nishi Y, Funakoshi S, Yamada Y and Seino Y "Tacrolimus suppresses glucose-induced release from pancreatic islets by reducing glucokinase activity." Am J Physiol Endocrinol Metab 2004. **288**: E365-E371.

Rahman ANA, Tett SE and Staatz CE "Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in patients with autoimmune disease." Clin Pharmacokinet 2013. **52**: 303-331.

Ramanathan A and Schreiber SL "Direct control of mitochondrial function by mTOR." PNAS 2009. **106**(52): 22229-22232.

Rath T "Tacrolimus in transplant rejection." Expert Opin Pharmacother 2013. **14**(1): 115-122.

Regueira TB, Kildegaard KR, Hansen BG, Mortensen UH, Hertweck C and Nielsen J "Molecular basis for mycophenolic acid biosynthesis in Penicillium brevicompactum." Applied Environ Microbiol 2011. **77**(9): 3035-3043.

Relling M, Gardner E, Sandborn W, Schmiegelow K, Pui C, Yee S, Stein C, Carrillo M, Evans W, Klein T and CPIC "Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing." Clin Pharmacol Ther 2011. **89**(3): 387-391.

Rioux JD and Abbas AK "Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease." Nature 2005. **435**: 584-589.

Roberts DJ, Tan-Sah VP, Ding EY, Smith JM and Miyamoto S "Hexokinase-II positevely regulates glucose starvation-induced autophagy through TORC1 inhibition." Mol Cell 2014. **53**: 521-533.

Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Carreño-Fuentes L and Moreno-Sánchez R "Targeting of cancer energy metabolism." Mol Nutr Food Res 2009. **53**: 29-48.

Rose NR "Prediction and prevention of autoimmune disease in the 21st century: a review and preview." Am J Epidemiol 2015. **183**(5): 403-406.

Rothfuss KS, Stange EF and Herrlinger KR "Extraintestinal manifestations and complications in inflammatory bowel diseases." World J Gastroenterol 2006. **12**(30): 4819-4831.

Rudin S, Marable M and Huang RS "The promise of pharmacogenomics in reducing toxicity during acute lymphoblastic leukemia maintenance treatment." Genomics Proteomics Bioinformatics 2017. **15**: 82-93.

Rutgeerts P, Löfberg R, Malchow H, Lamers C, Olaison G, Jewell D, Danielsson A, Goebell H, Thompsen O and Lorenz-Meyer H "A comparison of budenoside with prednisolone for active Crohn's disease." N Engl J Med 1994. **331**(13): 842-845.

Rye C, Wise R, Jurukovski V, DeSaix J, Choi J and Avissar Y 2016. "Biology. Chapter 42. The immune system." Retrieved 13/04/2017, from https://openstax.org/details/books/biology.

Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T and Ono M "Regulatory T cells and immune tolerance." Cell 2008. **133**: 775-787.

Salani B, Rio AD, Marini C, Sambuceti G, Cordera R and Maggi D "Metformin, cancer and glucose metabolism." Endocr-Relat Cancer 2014. **21**: R461-R471.

Sandborn W, Feagan B and Lichtenstein G "Medical management of mild to moderate Crohn's disease: evidence-based treatment algorithms for induction and maintenance of remission." Aliment Pharmacol Ther 2007. **26**(7): 987-1003.

Saunders RN, Metcalfe MS and Nicholson ML "Rapamycin in transplantation: a review of the evidence." Kidney Int 2001. **59**: 3-16.

Sayegh MH and Carpenter CB "Transplantation 50 years later-- progress, challenges, and promises." N Engl J Med 2004. **351**(26): 2761-2766.

Scharping NE, Menk AV, Moreci RS, Whetstone RD, Dadey RE, Watkins SC, Ferris RL and Delgoffe GM "The tumor microenvironment represses T cell mitochondrial biogenesis to drive intratumoral T cell metabolic insuficiency and disfunction." Immunity 2016. **45**: 374-388.

Schieke SM, Phillips D, McCoy JP, Aponte AM, Shen R-F, Balaban RS and Finkel T "The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity." J Biol Chem 2006. **281**(37): 27643-27652.

Sehgal S "Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action." Transpl Proc 2003. **35**(Suppl 3A): 7S-14S.

Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, Pan Y, Simon MC, Thompson CB and Gottlieb E "Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-1a prolyl hydroxylase." Cancer Cell 2005. **7**: 77-85.

Semenza GL "Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway." Sci Signal 2007. (407): 1-3.

Semenza GL "HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism." Curr Opin Genet Dev 2010. **20**(1): 51-56.

Seow C, Benchimol E, Griffiths A, Otley A and Steinhart A "Budesonide for induction of remission in Crohn's disease." Cochrane Database Syst Rev 2008. **3**.

Serra JM, Gutiérrez A, Alemany R, Navarro M, Ros T, Saus C, Ginés J, Sampol A, Amat JC, Serra-Moisés L, Martín J, Galmés A, Vögler O and Besalduch J "Inhibition of c-myc down-regulation by sustained extracellular signal-regulated kinase activation prevents the antimetabolite methtrexate- and gemcitabine-induced differentiation in non-small-cell lung cancer cells." Mol Pharmacol 2008. **73**: 1679-1687.

Seto B "Rapamycin and mTOR: a serendipitous discovery and implications for breast cancer." Clin Trans Med 2012. **1**(29): 1-7.

Shan J, Feng L, Li Y, Sun G, Chen X and Chen P "The effects of rapamycin on regulatory T cells: its potential time-dependent role in inducing transplant tolerance." Immunol Lett 2014. **162**: 74-86.

Shen C and Jr WGK "The VHL/HIF axis in clear cell renal carcinoma." Semin Cancer Biol 2013. **23**(1): 18-25.

Shihab F, Christians U, Smith L, Wellen JR and Kaplan B "Focus on mTOR inhibitors and tacrolimus in renal transplantation: pharmacokinetics, exposure-response relationships, and clinical outcomes." Transpl Immunol 2014. **31**: 22-32.

Shrestha B, Haylor J and Raftery A "Historical perspectives in kidney transplantation: an updated review." Progr Transplant 2015. **25**(1): 64-76.

Simon N, Morin C, Urien S, Tillement J-P and Bruguerolle B "Tacrolimus and sirolimus decrease oxidative phosphorylation of isolated rat kidney mitochondria." Br J Pharmacol 2003. **138**: 369-376.

Sinclair LV, Rolf J, Emslie E, Shi YB, Taylor PM and Cantrell DA "Control of amino-acid transport by antigen receptors coordinates the metabolic reprogramming essential for T cell differentiation." Nat Immunol 2013. **14**(5): 500-508.

Singh G, Singh SK, König A, Reutlinger K, Nye MD, Adhikary T, Eilers M, Gress TM, Fernandez-Zapico ME and Ellenrieder V "Sequential activation of NFAT and c-myc transcription factors mediates the TGF-B switch from a suppressor to a promoter of cancer cell proliferation." J Biol Chem 2010. **285**(35): 27241-27250.

Slack M, Wang T and Wang R "T cell metabolic reprogramming and plasticity." Mol Immunol 2015. **68**(2 Pt C): 507-512.

So T and Croft M "Regulation of PI-3-Kinase and Akt signaling in T lymphocytes and other cells by TNFR family molecules." Front Immunol 2013. (139): 1-11.

Soga T "Cancer metabolism: key players in metabolic reprogramming." Cancer Sci 2013. **104**(3): 275-281.

Song K, Li M, Xu X, Xuan L, Huang G and Liu Q "Resistance to chemotherapy is associated with altered glucose metabolism in acute myeloid leukemia." Oncol Lett 2016. **12**(1): 334-342.

Staatz CE and Tett SE "Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients." Clin Pharmacokinet 2007. **46**(1): 13-58.

Stanton RC "Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival." IUBMB Life 2012. **64**(5): 362-369.

Stark A, Zhang W, Mi S, Duan S, O'Donnell P, Huang R and Dolan M "Heritable and non-genetic factors as variables of pharmacologic phenotypes in lymphoblastoid cell lines." Pharmacogenomics J 2010. **10**(6): 505-512.

Steinhart A, Ewe K, Griffiths A, Modigliani R and Thompsen O "Corticosteroids for maintenance of remission in Crohn's disease." Cochrane Database Syst Rev 2003. **4**.

Strober W, Fuss I and Mannon P "The fundamental basis of inflammatory bowel disease." J Clin Invest 2007. **117**(3): 514-521.

Stryer L, Berg JM and Tymoczko JL (2007). Nucleotide Biosynthesis. Biochemistry. W. Freeman. New York

Sugiyama K, Satoh H, Saito K, Takahashi K, Saito N and Hirano T "Immunosuppressive efficacy of mycophenolate mofetil when compared with azathioprine and mizoribine against peripheral lymphocytes from renal transplant recipients." Transpl Int 2005. **18**(5): 590-595.

Szumlanski C, Otterness D, Her C, Lee D, Brandriff B, Kelsell D, Spurr N, Lennard L, Wieben E and Weinshilboum R "Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human gene cloning and characterization of a common polymorphism." DNA Cell Biol 1996. **15**(1): 17-30.

Takebe N, Cheng X, Fandy TE, Srivastava RK, Wu S, Shankar S, Bauer K, Shaughnessy J and Tricot G "IMP dehydrogenase inhibitor mycophenolate mofetil induces caspase-dependent apoptosis and cell cycle inhibition in multiple myeloma cells." Mol Cancer Ther 2006. **5**(2): 457-466.

Tanimoto K, Makino Y, Pereira T and Poellinger L "Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1α by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein." EMBO J 2000. **19**(16): 4298-4309.

Tapner MJ, Jones BE, Wu WM and Farrell GC "Toxicity of low dose azathioprine and 6-mercaptopurine in rat hepatocytes. Roles of xanthine oxidase and mitochondrial injury." J Hepatol 2004. **40**: 454-463.

Tarrado-Castellarnau M, Atauri Pd and Cascante M "Oncogenic regulation of tumour metabolic reprogramming." Oncotarget 2016. **7**(38): 62726-62753.

Taylor AL, Watson CJ and Bradley JA "Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy." Crit Rev Oncol Hematol 2005. **56**(1): 23-46.

Tedesco D and Haragsim L "Cyclosporine: a review." J Transplant 2012. **2012**: 1-7.

Thomas CW, Myhre GM, Tschumper R, Sreekumar R, Jelinek D, McKean DJ, Lipsky JJ, Sandborn WJ and Egan LJ "Selective inhibition of inflammatory gene expression in activated T lymphocytes: a mechanism of immune suppression by thiopurines." J Pharmacol Exp Ther 2005. **312**(2): 537-545.

Thornton C, Al-Rashed F, Calay D, Birdsey G, Bauer A, Mylroie H, Morley B, Randi A, Haskard D, Boyle J and Mason J "Methotrexate-mediated activation of an AMPK-CREC-dependent pathway: a novel mechanism for vascular protection in chronic systemic inflammation." Ann Rheum Dis 2015. 1-10.

Tiede I, Fritz G, Strand S, Poppe D, Dvorsky R, Strand D, Lehr HA, Wirtz S, Becker C, Atreya R, Mudter J, Hildner K, Bartsch B, Holtmann M, Blumberg R, Walczak H, Iven H, Galle PR, Ahmadian MR and Neurath MF "CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes." J Clin Invest 2003. **111**(8): 1133-1145.

Tomm JM, Otto W, Servos U, Bertram B, Bergen Mv and Baumann S "Starvation of Jurkat T cells causes metabolic switch from glycolysis to lipolysis as revealed by comprehensive GC-qMS." J I Omics 2013. **3**(1): 70-74.

Tong X, Zhao F and Thompson CB "The molecular determinants of de novo nucleotide biosynthesis in cancer cells." Curr Opin Genet Dev 2009. **19**(1): 32-37.

Trepanier DJ, Gallant H, Legatt DF and Yatscoff RW "Rapamycin: distribution, pharmacokinetics and therapeutic range investigations: an update." Clin Biochem 1998. **31**: 345-351.

Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM and Fugger L "Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis." Am J Pathol 2008. **172**(1): 146-155.

van Gelder T, van Schaik RH and Hesselink DA "Pharmacogenetics and immunosuppressive drugs in solid organ transplantation." Nat Rev Nephrol 2014. **10**(12): 725-731.

Vander-Heiden MG, Cantley L and Thompson CB "Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation." Science 2009. **324**: 1029-1033.

Viollet B, Guigas B, Garcia NS, Leclerc J, Foretz M and Andreelli F "Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview." Clin Sci (Lond) 2012. **122**(6): 253-270.

Wahren-Herlenius M and Dörner T "Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease." Lancet 2013. **382**: 819-831.

Waickman AT and Powell JD "mTOR, metabolism, and the regulation of T-cell differentiation and function." Immunol Rev 2012. **249**: 43-58.

Walczak-Drzewiecka A, Ratajewski M, Wagner W and Dastych J "HIF-1A is up-regulated in activated mast cells by a process that involves calcineurin and NFAT." J Immunol 2008. **181**: 1665-1672.

Waldmann H and Cobbold S "Exploiting tolerance processes in transplantation." Science 2004. **305**(209-212).

Walsh PT, Strom TB and Turka LA "Routes to transplant tolerance versus rejection: the role of cytokines." Immunity 2004. **20**: 121-131.

Wang R, Dillon CP, Shi LZ, Milasta S, Carter R, Finkelstein D, McCormick LL, Fitzgerald P, Chi H, Munger J and Green DR "The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation." Immunity 2011. **35**(6): 871-882.

Wang R and Green DR "Metabolic checkpoints in activated T cells." Nat Immunol 2012a. **13**(10): 907-915.

Wang R and Green DR "Metabolic reprogramming and metabolic dependency in T cells." Immunol Rev 2012b. **249**(1): 14-26.

Wang S, Kang X, Cao S, Cheng H, Wang D and Geng J "Calcineurin/NFATc1 pathway contributes to cell proliferation in hepatocellular carcinoma." Dig Dis Sci 2012. **57**: 3184-3188.

Warburg O "On the origin of cancer cells." Science 1956. **123**(3191): 309-314.

Webster A, Woodroffe R, Taylor R, Chapman J and Craig J "Tacrolimus versus cyclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients." Cochrane Database of Syst Rev 2005. **19**(4): CD003961.

Williams MA and Bevan MJ "Effector and memory CTL differentiation." Annu Rev Immunol 2007. **25**: 171-192.

Wing K and Sakaguchi S "Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity." Nat Immunol 2010. **11**(1): 7-13.

Wiseman AC "Immunosuppressive Medications." Clin J Am Soc Nephrol 2016. **11**(2): 332-343.

Woillard J, Chouchana L, Picard N, Loriot M and RNPGX "Pharmacogenetics of immunosuppressants: State of the art and clinical implementation - recommendations from the French National Network of Pharmacogenetics (RNPGx)." Therapie 2017. **72**(2): 285-299.

Wolk K, Witte E, Wallace E, Döcke W-D, Kunz S, Asadullah K, Volk H-D, Sterry W and Sabat R "IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis." Eur J Immunol 2006. **36**: 1309-1323.

Wood KJ and Sakaguchi S "Regulatory T cells in transplantation tolerance." Nat Rev Immunol 2003. **3**: 199-210.

Wouters BG and Koritzinsky M "Hypoxia signaling through mTOR and the unfolded protein response in cancer." Nat Rev Cancer 2008. **8**: 851-864.

Wu DJ and Adamopoulos IE "Autophagy and autoimmunity." Clin Immunol 2017. **176**(55-62).

Wu T-Y, Fridley BL, Jenkins GD, Batzler A, Wang L and Weinshilboum RM "Mycophenolic acid response biomarkers: a cell line model system-based genome-wide screen." Int Immunopharmacol 2011. **11**: 1057-1064.

Xu R and Huang P "A new role for PHD in chemotherapy." Cancer Cell 2012. **22**(2): 143-144.

Yamamoto N, Oliveira BM, Campello AD, Lopes LCV and Klüppel LW "Methotrexate: studies on the cellular metabolism. I. Effect on mitochondrial oxygen uptake and oxidative phosphorylation." Cell Biochem Funct 1988. **6**: 61-66.

Yang C, Ko B, Hensley CT, Jiang L, Wasti AT, Kim J, Sudderth J, Calvaruso MA, Lumata L, Mitsche M, Rutter J, Merritt ME and DeBerardinis RJ "Glutamine oxidation maintains the TCA cycle and cell survival during impaired mitochondrial pyruvate transport." Mol Cell 2014. **56**(3): 414-424.

Yang K, Shrestha S, Zeng H, Karmaus PW, Neale G, Vogel P, Guertin DA, Lamb RF and Chi H "T cell exit from quiescence and differentiation into Th2 cells depend on Raptor-mTORC1-mediated metabolic reprogramming." Immunity 2013. **39**(6): 1043-1056.

Yang Z, Goronzy JJ and Weyand CM "Autophagy in autoimmune disease." J Mol Med 2015a. **93**: 707-717.

Yang Z, Matteson EL, Goronzy JJ and Weyand CM "T-cell metabolism in autoimmune disease." Arthritis Res Ther 2015b. **17**(29): 1-10.

Yap M, Brouard S, Pecqueur C and Degauque N "Targeting CD8 T-cell metabolism in transplantation." Front Immunol 2015. **6**(547): 1-8.

Yin D, Xia X, Zhang J, Zhang S, Liao F, Zhang G, Zhang Y, Hou Q, Yang X, Wang H, Ma Z, Wang H, Zhu Y, Zhang W, Wang Y, Liu B, Wang L, Xu H and Shu Y "Impact of NUDT15 polymorphisms on thiopurines-induced myelotoxicity and thiopurines tolerance dose." Oncotarget 2017. **8**(8): 13575-13585.

Yin Y, Choi S, Xu Z, Perry D, Seay H, Croker B, Sobel E, Brusko T and Morel L "Normalisation of CD4+ T cell metabolism reverses lupus." Sci Transl Med 2015. **7**(274ra18).

Yoo Y, Na T, Yang W, Kim H, Lee I, Kong G, Chung J and Lee M "6-mercaptopurine, an activator of Nur77, enhances transcriptional activity of HIF-1a resulting in new vessel formation." Oncogene 2007. **26**: 3823-3834.

Zaza G, Cheok M, Yang W, Panetta J, Pui C, Relling M and Evans W "Gene expression and thioguanine nucleotide disposition in acute lymphoblastic leukemia after in vivo mercaptopurine treatment." Blood 2005. **106**(5): 1778-1785.

Zerra P, Bergsagel J, Keller FG, Lew G and Pauly M "Maintenace treatment with low-dose mercaptopurine in combination with allopurinol in children with acute lymphoblastic leukemia and mercaptopurine-induced pancreatitis." Pediatr Blood Cancer 2016. **63**: 712-715.

Zhang F, Fu L and Wang Y "6-thioguanine induces mitochondrial dysfunction and oxidative DNA damage in acute lymphoblastic leukemia cells." Mol Cell Proteom 2013. **12**: 3803-3811.

Zhao D, Li S and Sun Q "Sirolimus-based immunosuppressive regimens in renal transplantation: a systemic review." Transpl Proc 2016. **48**: 3-9.

Zhdanov AV, Waters AH, Golubeva AV and Papkovsky DB "Differential contribution of key metabolic substrates and cellular oxygen in HIF signalling." Exp Cell Res 2015. **330**(1): 13-28.

Zhong W, Yi Q, Xu B, Li S, Wang T, Liu F, Zhu B, Hoffmann PR, Ji G, Lei P, Li G, Li J, Li J, Olkkonen VM and Yan D "ORP4L is essential for T-cell acute lymphoblastic leukemia cell survival." Nat Commun 2016.

Zimm S, Collins J, Riccardi R, O'Neill D, Narang P, Chabner B and Poplack D "Variable bioavailability of oral mercaptopurine. Is maintenance chemotherapy in acute lymphoblastic leukemia being optimally delivered?" N Engl J Med 1983. **308**(17): 1005-1009.

RÉSUMÉ: En cas d'activation, les lymphocytes T opèrent un processus de reprogrammation métabolique qui favorise la prolifération, la polarisation et la différenciation cellulaire. Cette conversion métabolique est coordonnée par des «checkpoints» métaboliques, principalement Myc, HIF-1α, PI3K/Akt, AMPK et mTOR. La 6-mercaptopurine (6-MP), l'acide mycophénolique (MPA) et la rapamycine (Rapa) sont des médicaments immunosuppresseurs et antiprolifératifs prescrits dans les maladies auto-immunes, inflammatoires, en prévention du rejet de transplant et dans la leucémie aiguë lymphoblastique de l'enfant (6-MP). Alors que l''inhibition de mTOR par la rapamycine est bien connue, l'impact de ces molécules sur la reprogrammation métabolique lymphocytaire reste à établir. L'objectif de ce travail de thèse est de caractériser les modifications du métabolisme énergétique dans des lymphocytes T humains en prolifération (lignée Jurkat) sous l'influence de la 6-MP, le MPA et la Rapa. Nous avons identifié une signature transcriptomique spécifique de chacune de ces molécules ciblant les enzymes et transporteurs impliqués dans la glycolyse, la glutaminolyse, et la synthèse des nucléotides, suggérant que ces médicaments ont des effets différentiels sur le métabolisme cellulaire. La 6-MP induit une diminution des concentrations intracellulaires en ATP, suivie d'une activation du senseur énergétique AMPK. La cible d'AMPK, mTOR, est inhibée par la 6-MP, et l'expression de HIF1α et Myc est également réduite. La conséquence fonctionnelle de cette inhibition est une réduction significative des flux glycolytique et glutaminolytique, en l'absence d'effet sur le transport intracellulaire du glucose. Le MPA est responsable d'une diminution transitoire des concentrations intracellulaires en ATP, en lien avec une inhibition de la synthèse des bases puriques, entraînant l'activation d'AMPK. On observe une réduction des flux glycolytique et glutaminolytique sous MPA, associée à une diminution de la captation du glucose. Le MPA et la Rapa réduisent le flux de la glycolyse aérobie et la production de lactate. Enfin, l'expression de HIF1-α et Myc, est également réduite par ces deux molécules. En conclusion, la 6-MP, le MPA et la Rapa modifient profondément le métabolisme énergétique des lymphocytes T en prolifération, en provoquant un stress énergétique, en réduisant les flux glycolytique et glutaminolytique, et en inhibant les «checkpoints» métaboliques HIF-1α et Myc. Ces résultats originaux pourraient constituer le rationnel pour la mise au point de stratégies thérapeutiques innovantes, notamment avec des combinaisons de molécules ciblant spécifiquement le métabolisme énergétique cellulaire à des fins antiprolifératives et immunosuppressives.

ABSTRACT: T cells undergo rapid metabolic reprogramming to support proliferation and to shape polarization and function. This metabolic switch is mainly regulated by the metabolic checkpoints Myc, HIF-1α, PI3K/Akt, AMPK and mTOR. The antiproliferative and immunosuppressive molecules 6-mercaptopurine (6-MP), mycophenolic acid (MPA) and rapamycin (Rapa) are prescribed in autoimmune diseases, inflammatory bowel diseases, to avoid organ rejection after transplantation and in acute lymphoblastic leukemia. Whether these molecules impact proliferating T cell metabolic reprogramming is unknown. The objective of this thesis is to provide a comprehensive characterization of the changes in energetic metabolism that occurs in proliferating T cells (Jurkat cell line) after treatment with 6-MP, MPA and Rapa. We identified a drug-specific transcriptome signature consisting of the key enzymes and transporters involved in glycolysis, glutaminolysis or nucleotide synthesis, resulting from significantly different effects on metabolic reprogramming. 6-MP rapidly reduces intracellular ATP concentration, leading to the activation of AMPK. In turn, mTOR, an AMPK target, was inhibited, and the expression of HIF-1α and Myc was reduced upon 6-MP incubation. As a consequence of these inhibitions**,** glucose and glutamine fluxes were strongly reduced. No difference was observed on glucose uptake upon exposition to 6-MP. MPA produced an early and transient drop in the intracellular ATP content related to the inhibition of *de novo* synthesis of purines, leading to the activation of the energy sensor AMPK. The analysis of the glycolytic or glutaminolytic fluxes indicated that MPA decreases glycolytic flux, consistent with a reduction in glucose uptake, but also in the oxidation of glutamine. In addition, MPA and Rapa reduce aerobic glycolysis and lactate production. Consistent with this global shutdown in glycolysis and glutaminolysis, the expression of HIF-1α and Myc, promoting the activation of glycolysis and glutaminolysis, was inhibited by MPA and Rapa. In conclusion, 6-MP, MPA and Rapa profoundly impacts the cellular metabolism of proliferating T cells by generating an energetic distress, decreasing the glycolytic and glutaminolytic fluxes and by targeting the metabolic checkpoints HIF-1α and Myc. These findings open interesting perspectives for novel combinatorial therapeutic strategies targeting metabolic checkpoints to block the proliferation of T cells.