

Université de Montréal

Impact de la leucémie lymphoblastique aiguë pédiatrique et du méthotrexate sur le développement des complications cardiométaboliques dans un modèle murin xénogénique.

Par

Chloé Normandeau, Dt.P

Diététiste-Nutritionniste

Département de Nutrition, Université de Montréal

Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maîtrise

en nutrition- M.Sc. avec mémoire (2-320-1-0)

4 janvier 2024

© Chloé Normandeau, 2024

Université de Montréal

Département de Nutrition, Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé

Impact de la leucémie lymphoblastique aiguë pédiatrique et du méthotrexate sur le développement des complications cardiométaboliques dans un modèle murin xénogénique

Présenté par

Chloé Normandeau

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Rémi Rabasa-Lhoret

Président-rapporteur

Valérie Marcil

Directrice de recherche

Matthieu Ruiz

Membre du jury

Résumé

Problématique. Bien que la survie des enfants atteints de la leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) se soit grandement améliorée dans les dernières décennies, les survivants de la LLA de l'enfant sont nombreux à développer des comorbidités métaboliques sévères, comme l'obésité, des perturbations du métabolisme des glucides et des lipides ainsi que des maladies cardiovasculaires. À ce jour, peu de données probantes sont disponibles concernant les mécanismes sous-jacents au développement de ces complications cardiométaboliques. Cependant, les impacts de la maladie, du traitement et de la dysbiose intestinale sur le développement de ces désordres métaboliques sont des exemples d'hypothèses émises dans la littérature.

Objectifs. Les objectifs sont de déterminer les impacts de la LLA pédiatrique et du méthotrexate sur le poids, la dyslipidémie et la résistance à l'insuline. De plus, nous souhaitons déterminer la relation entre le microbiote intestinal et le développement de complications métaboliques et évaluer les différences sexuelles concernant la réponse métabolique à la maladie et au traitement.

Méthodes. Quarante souris NOD-SCID IL2R γ null (NSG) avec un nombre égal de mâles et de femelles ont été divisés en 3 groupes : contrôle (injection de tampon phosphate salin (PBS), non traitée, n=8), non-traité (greffe de LLA, non traitée, n=16) et traité (greffe de LLA, traitée au méthotrexate, n=16) avec une dose de 5 mg/kg, 4 jours consécutifs pour une durée de 8 semaines. Un test d'hyperglycémie orale provoquée a été exécuté afin d'évaluer la tolérance au glucose. Le poids, la glycémie, les lipides sanguins, des échantillons de selles et certains tissus (le foie, les intestins et le tissu adipeux) ont été collectés à plusieurs moments durant l'expérience. Des Western blot ont été effectués afin de mesurer l'expression protéique de protéines clef du métabolisme dans le foie. La composition (abondance relative) et la diversité (α -diversité et β -diversité) du microbiote intestinal et la teneur fécale en acides gras à chaîne courte (AGCC) ont été mesurées. Les différences entre les groupes, intrasexe et longitudinales ont été analysées.

Résultats. Nos résultats démontrent que la maladie elle-même a un impact sur les niveaux de cholestérol total dans le plasma et dans le foie des souris femelles. Le traitement au méthotrexate a induit une dysglycémie, à la fois à court terme et à long terme après le traitement, et a augmenté les niveaux de HDL-c dans le plasma des souris femelles. Dans le foie, une augmentation de l'activité de l'AMPK α et une diminution de l'expression protéique de FAS ont été observées chez les souris leucémiques, comparativement aux contrôles. L'analyse longitudinale du microbiote intestinal démontre des différences dans la composition du microbiote intestinal (abondance relative de la famille bactérienne S24_7 chez les mâles et β -diversité chez les femelles) et une réduction considérable du contenu fécal en acides gras en chaînes courtes (AGCC) après les traitements. Au sacrifice, les souris traitées avaient un ratio Firmicutes/Bacteroidetes inférieur comparé aux contrôles. Les souris mâles leucémiques avaient des niveaux moyens d'AGCC supérieurs et les femelles leucémiques avaient des niveaux d'AGCC inférieurs aux contrôles et cette différence était plus marquée chez les femelles traitées.

Conclusion. La maladie seule provoque des changements dans le métabolisme lipidique, alors que le traitement avec le méthotrexate aggrave ces désordres en plus d'affecter les paramètres glucidiques. Ces effets ont principalement été observés chez les souris femelles. Des changements des protéines hépatiques clés impliquées dans la régulation du métabolisme des lipides et des glucides et au niveau du microbiote intestinal pourraient être des mécanismes expliquant le développement de ces complications chez les femelles.

Mots-clés : cancer pédiatrique, leucémie lymphoblastique aiguë, méthotrexate, souris NSG, complications cardiométaboliques, dyslipidémie, résistance à l'insuline, microbiote intestinal, acides gras à chaînes courtes.

Abstract

Context. Although survival of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) has greatly improved in recent decades, many survivors of childhood ALL develop severe metabolic comorbidities, such as obesity, disturbances in carbohydrate and lipid metabolism, and cardiovascular disease. To date, little evidence is available concerning the mechanisms underlying the development of these cardiometabolic complications. However, the impact of the disease, the treatment and intestinal dysbiosis on the development of these metabolic disorders are examples of hypotheses put forward in the literature.

Objectives. The objectives are to determine the impact of pediatric ALL and methotrexate on weight, dyslipidemia and insulin resistance. In addition, we aim to determine the relationship between the gut microbiota and the development of metabolic complications, and to assess sex differences in metabolic response to disease and treatment.

Methods. Forty NOD-SCID IL2R γ ^{null} (NSG) mice with equal numbers of males and females were divided into 3 groups: control (Phosphate-buffered saline injection (PBS), non-treated, n=8), untreated (LLA graft, non-treated, n=16) and treated (LLA graft, treated with methotrexate, n=16) with a dose of 5 mg/kg, 4 consecutive days for 8 weeks. An OGTT test was performed to assess glucose tolerance. Weight, blood glucose, blood lipids, stool samples and selected tissues (liver, intestine and adipose tissue) were collected at several points during the experiment. Western blots were performed to measure protein expression of key metabolic proteins in liver. The composition (relative abundance) and diversity (α -diversity and β -diversity) of the gut microbiota and the fecal content of short-chain fatty acids (SCFAs) were measured. Differences between groups, within sex and between longitudinal data were analyzed.

Results. Our results show that the disease itself had an impact on the cholesterol levels in plasma and in the liver of female mice. Methotrexate treatment induced dysglycemia, both and in the long term after the treatment and increased plasma HDL-c levels of female mice. In the liver, an increase in AMPK α activity and a decrease in FAS protein expression were observed in leukemic mice, compared with controls. Longitudinal analysis of the gut microbiota demonstrated

differences in gut microbiota composition (relative abundance of the S24_7 bacterial family in males and β -diversity in females) and a considerable reduction in fecal short-chain fatty acid (SCFA) content after methotrexate treatment. At sacrifice, treated mice had a lower Firmicutes/Bacteroidetes ratio than controls. Male leukemic mice had higher mean SCFA levels, and female leukemic mice had lower SCFA levels than controls, with this difference being more marked in treated females.

Conclusion. The disease alone causes changes in lipid metabolism, while treatment with methotrexate aggravates these disorders and affects carbohydrate parameters. These effects were mainly observed in female mice. Changes in key hepatic proteins involved in the regulation of lipid and carbohydrate metabolism and in the intestinal microbiota could be mechanisms explaining the development of these complications in females.

Keywords: pediatric cancer, acute lymphoblastic leukemia, methotrexate, NSG mouse, cardiometabolic complications, dyslipidemia, insulin resistance, gut microbiota, short-chain fatty acids.

Table des matières

Résumé.....	4
Abstract	6
Table des matières	8
Liste des tableaux.....	14
Liste des figures.....	15
Liste des sigles et abréviations.....	16
Remerciements	21
Chapitre 1 – Introduction	22
Chapitre 2 – Revue de littérature.....	25
2.1 Cancers pédiatriques.....	25
2.2 Leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) de l'enfant	25
2.2.1 Physiopathologie et symptômes.....	25
2.2.1.1 Infections.....	26
2.2.1.2 Pâleur, fatigue, anémie et dyspnée	27
2.2.1.3 Apparitions d'ecchymoses et saignements.....	27
2.2.1.4 Douleurs osseuses.....	27
2.2.1.5 Dépôt de lymphoblastes	28
2.2.1.6 Hyperleucocytose.....	28
2.2.2 Types de LLA.....	29
2.2.3 Diagnostic.....	29
2.2.3.1 Observation des signes cliniques	29
2.2.3.2 Prélèvement sanguin.....	29

2.2.3.3 Prélèvement de la moelle osseuse.....	30
2.2.3.4 Immunophénotypage.....	30
2.2.3.5 Génotypage.....	30
2.2.3.6 Infiltration lymphocytaire	31
2.2.4 Facteurs de risque et pronostic.....	32
2.2.4.1 Facteurs de risque de développer la LLA pédiatrique.....	32
2.2.4.1.1 Condition génétique.....	32
2.2.4.1.2 Poids à la naissance	33
2.2.4.1.3 Facteurs environnementaux	33
2.2.4.2 Facteurs de risque de rechute et mauvais pronostic.....	33
2.2.4.2.1 Âge au diagnostic	34
2.2.4.2.2 Nombre de globules blancs en circulation.....	34
2.2.4.2.3 Infiltration de lymphoblastes.....	34
2.2.4.2.4 Immunophénotype	34
2.2.4.2.5 Anomalies associées au nombre de chromosomes.....	35
2.2.4.2.6 Mutations génétiques	35
2.2.4.2.7 Évaluation de la maladie résiduelle	36
2.2.4.2.8 Ethnicité et statut socio-économique.....	36
2.2.5 Taux de survie	37
2.2.6 Traitements de la LLA.....	38
2.2.6.1 Phases de traitement	38
2.2.6.1.1 Induction	38
2.2.6.1.2 Consolidation/intensification.....	39
2.2.6.1.3 Maintien	39

2.2.7 Classification des agents chimiothérapeutiques et mécanismes d'action	40
2.2.7.1 Anthracyclines	40
2.2.7.2 Antimétabolites.....	40
2.2.7.3 Alkylants	40
2.2.7.4 Alcaloïdes	41
2.2.7.5 Asparaginases.....	41
2.2.7.6 Corticostéroïdes	41
2.2.8 Chimiothérapie intrathécale	42
2.2.9 Radiothérapie.....	43
2.2.10 Thérapies avancées	44
2.2.10.1 Immunothérapie	44
2.2.10.2 Inhibiteurs de tyrosine kinase	44
2.2.10.3 Transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétique	45
2.2.11 Gestion des complications durant le traitement	45
2.3 Complications associées à la LLA et mécanismes proposés	46
2.3.1 Complications cardiométaboliques au diagnostic	46
2.3.2 Complications aiguës pendant les traitements et à court-terme après les traitements	47
2.3.3 Complications cardiométaboliques à long-terme.....	49
2.3.4 Autres complications à long terme	51
2.3.5 Effet du sexe.....	52
2.3.6 Mécanismes proposés.....	53
2.3.6.1 Le SO et l'inflammation	54
2.3.6.1.1 Lien entre le SO, l'inflammation et les complications cardiométaboliques ...	54

2.3.6.1.2 Lien entre le SO, l'inflammation et le cancer	56
2.3.6.1.3 Le SO et l'inflammation pendant les traitements antinéoplasiques	58
2.3.6.1.4 Lien entre la radiothérapie et les complications cardiométaboliques et hormonales	59
2.3.6.1.5 Lien entre la chimiothérapie et les complications cardiométaboliques.....	60
2.3.6.1.6 Le SO et l'inflammation chez les survivants de cancer pédiatrique	62
2.3.6.1.7 Lien entre l'inflammation et les complications cardiométaboliques chez les survivants de cancer pédiatrique	62
2.3.6.2 La modulation du microbiote intestinal et de ses métabolites dérivés	63
2.3.6.2.1 La dysbiose intestinale et endotoxémie métabolique	63
2.3.6.2.2 Lien entre la dysbiose intestinale et les complications métaboliques	65
2.3.6.2.3 Lien entre les AGCC et les complications métaboliques.....	66
2.3.6.2.4 La dysbiose intestinale pendant les traitements et chez les survivants de cancer pédiatrique	67
2.3.6.3 Habitudes alimentaires et qualité nutritionnelle.....	69
2.3.6.3.1 Lien entre les habitudes alimentaires et les complications cardiométaboliques	69
2.3.6.3.2 Habitudes alimentaires des survivants de cancer pédiatrique comparées à des recommandations nutritionnelles.....	70
2.3.6.3.3 Habitudes alimentaires des survivants de cancer pédiatrique comparées à des contrôles.....	71
2.3.6.3.4 Habitudes alimentaires des survivants de cancer pédiatrique comparées à la population générale	72
2.3.6.3.5 Lien entre les habitudes alimentaires et les complications cardiométaboliques chez les survivants de cancer pédiatrique	72
2.4 Souris NSG	73

2.4.1 Modèle murin pour la recherche sur le cancer	73
Chapitre 3 – Problématique, hypothèses et objectifs	75
3.1 Problématique.....	75
3.2 Hypothèses.....	76
3.3 Objectifs	76
3.3.1 Objectif principal	76
3.3.2 Objectifs spécifiques	77
Chapitre 4 – Méthodologie	78
4.1 Modèle murin.....	78
4.2 Taille de groupe.....	79
4.3 Xénogreffe de LLA pédiatrique.....	79
4.4 Évolution de la maladie	80
4.5 Traitement au méthotrexate	80
4.6 Profil glycémique.....	81
4.7 Sacrifice	81
4.8 Profil lipidique et biochimique	82
4.9 Évaluation du microbiote intestinal	82
4.10 Détermination du contenu fécal en acides gras à chaînes courtes	83
4.11 Expression protéique	83
4.12 Analyses statistiques	84
Chapitre 5 – Résultats	85
5.1 Contribution de l'étudiante.....	85
5.2 Article intégral.....	86
Chapitre 6 – Discussion	138

Chapitre 7 – Forces, limites, perspectives.....	146
Chapitre 8 - Conclusion	148
Références bibliographiques.....	150

Liste des tableaux

Tableau 1. – Facteurs de risque de rechute et éléments influençant le pronostic de la LLA pédiatrique.....	36
---	----

Liste des figures

Figure 1. – Physiopathologie de la LLA (Créée avec Biorender.com).....	26
Figure 2. – Schématisation des tests effectués pour diagnostiquer la LLA (Créée avec Biorender.com)32	
Figure 3. – Mécanismes d’action des différentes classes agents utilisées dans le traitement chimiothérapeutique de la LLA pédiatrique (Créée avec Biorender.com)	42
Figure 4. – Schématisation des traitements de la LLA (Créée avec Biorender.com)	46
Figure 5. – Schématisation des étapes du protocole expérimental et de la collecte des données (Créée avec Power Point).....	78

Liste des sigles et abréviations

LLA : Leucémie lymphoblastique aiguë

RI : Résistance à l'insuline

SM : Syndrome métabolique

SO : Stress oxydant

MCV : Maladies cardiovasculaires

LPS : Lipopolysaccharides

DBT2 : Diabète de type 2

AGCC : Acides gras à chaînes courtes

MTX : Méthotrexate

SNC : Système nerveux central

Cellules NK : Cellules Natural Killer

LMA : Leucémie myéloblastique aiguë

B-LLA : Leucémie lymphoblastique aiguë de type B

T-LLA : Leucémie lymphoblastique aiguë de type T

TDT : Désoxynucléotidyl transférase terminale

MPO : Myéloperoxydase

ITK : Inhibiteurs de tyrosine kinase

WGS : Séquençage du génome entier

RNA-seq : Séquençage du transcriptome

WES : Séquençage de l'exome entier

BCR : Breakpoint cluster region protein

ABL : ABelson Leukemia

ETP : Early T-cell *precursor ALL*

iAMP21 : Amplification intrachromosomique du chromosome 21 (iAMP21)

HTLV : Virus T-lymphotrope humain

MRM : Maladie résiduelle minime

DHR : Dihydrofolate réductase

RG : Récepteurs de glucocorticoïdes

ERG : Éléments de réponse aux glucocorticoïdes

I κ B- α : Inhibiteur du facteur nucléaire κ B

MKP-1 : Protéine kinase phosphatase 1 activée par les mitogènes

SLPI : Inhibiteur de la leucoprotéase sécrétoire

GILZ : protéine *Glucocorticoid-induced leucine zipper*

AP-1 : Protéine activatrice-1

NF- κ B : Facteur nucléaire- κ B

RTC : Radiothérapie crânienne

CAR-T : Récepteurs antigéniques chimériques

GCSH : Greffe de cellules souches hématopoïétique

HDL-c : Lipoprotéines à haute densité

Apo-A1 : Apolipoprotéine A1

LDL-c : Lipoprotéines à faible densité

IMC : Indice de masse corporel

CT : Cholestérol total

TG : Triglycérides

IGF-1 : Insulin-like Growth Factor One (somatomédine C)

CRP : Protéine C-réactive

ERO : Espèces réactives oxygénées

NOX : NADPH oxidase

CAT : Catalase (CAT)

SOD : Superoxyde dismutase

ON : Oxyde nitrique

AGE : *advanced glycation end products*

IL-1 β : Interleukine-1 β

IL-6 : Interleukine-6

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale- α

RTL : Récepteurs Toll-like

IL-8 : Interleukine 8

RBP4 : Retinol binding protein 4

MCP-1 : chemokine ligand 2

LBP : LPS-binding protein

SAA : Amyloïde A sérique

TBARS : Substances réactives à l'acide thiobarbiturique

ACTH : Hormone adrénocorticotrope

HOMA-IR: Homeostatic Model Assesement for Insulin resistance

IL-2 : Interleukine 2

HbA1c : Hémoglobine glyquée

IRF : Facteur de régulation de l'interféron

IFN- β : Interféron bêta

JAM : Molécules d'adhésion jonctionnelle

ZO-1 : Zonula occludens-1

Treg : Lymphocytes T régulateurs

HDAC : Histones désacétylases

PYY : Peptide YY

GLP-1: Glucagon-like peptide-1

NSG: NOD/SCID/gamma c-

OGTT: Test d'hyperglycémie orale provoquée

CRCHUSJ : Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine

OGG1: *8-oxoguanine DNA glycosylase*

Je dédie cet ouvrage à mon partenaire, pour son soutien et son amour.

À ma famille et ma maman pour m'avoir montré que tout est possible.

À Caroline, qui se bat actuellement contre le cancer.

À mon papa, double survivant.

Remerciements

J'aimerais offrir mon premier remerciement à Dre. Valérie Marcil, ma directrice de recherche, pour le support, les conseils judicieux et l'opportunité de rejoindre son équipe pour réaliser ce projet de recherche. Tes mots justes et ton écoute m'ont encouragée à donner le meilleur de moi-même et à repousser mes limites. J'en suis très reconnaissante.

Merci à tous les étudiants des laboratoires de Dre. Marcil et Dr. Levy, Abderrahim, Nickolas, Mireille, Francis, Mathilde, qui de près ou de loin, m'ont partagé leur savoir et m'ont aidé dans mes expériences. Votre précieux soutien a été grandement apprécié!

Un immense merci à Sophia, qui pendant son doctorat a mené l'étude pilote à l'origine de mon projet et qui m'a transmis toutes ses connaissances sur les souris. Merci de m'avoir si bien guidée au début de ma maîtrise alors que tout était nouveau pour moi. Je garderai de bons souvenirs de notre collaboration et de ces moments passés avec toi à l'animalerie.

Merci à tout le personnel de l'Animalerie du Centre de Recherche du CHU Sainte-Justine, sans qui rien de tout ça n'aurait été possible.

Merci à nos collaborateurs, Dr. Haddad et son équipe de nous avoir fourni les blastes et les souris et Dr. Stintzi qui détient l'expertise nécessaire pour effectuer l'analyse du microbiote intestinal.

Je remercie également Alain et Véronique, pour les discussions éclairantes et leur appui très important tout au long de mon parcours.

Une mention spéciale à mon amoureux, Felipe, à mes proches et à mes camarades de classe au baccalauréat en nutrition, Crystèle, Evelyne et Josianne, devenues de grandes amies, qui m'ont accompagnée et épaulée tout au long de cette aventure.

Chapitre 1 – Introduction

Le nombre de cas diagnostiqués de leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) est prédominant comparativement aux autres types de cancers pédiatriques [1, 2]. Ce cancer hématologique, issu d'une anomalie de différenciation des lymphocytes, engendre l'accumulation de cellules lymphoïdes immatures dans l'organisme, communément appelées blastes [1]. L'amélioration des méthodes de traitement permet à la majorité des enfants atteints de LLA de combattre la maladie et d'atteindre l'âge adulte [2]. Toutefois, cette épreuve vécue lors d'une période importante du développement d'un enfant occasionne des répercussions sur sa santé à long terme. En effet, les survivants de la LLA pédiatrique présentent un risque accru de souffrir d'obésité, de dyslipidémie, de résistance à l'insuline (RI) et d'hypertension, éléments caractérisant le syndrome métabolique (SM) [3, 4]. Les premiers signes de ces complications peuvent être observés au diagnostic [5-7] et demeurent présents pendant les traitements [8, 9] et même plusieurs années au terme du protocole de traitement [10, 11].

Ceci nous amène à nous questionner sur l'étiologie de ces comorbidités sérieuses et sur la contribution des différents facteurs en jeu sur la santé cardiométabolique des survivants de la LLA de l'enfant. Premièrement, l'augmentation du stress oxydant (SO) et de l'inflammation observée au diagnostic de cancer pourrait être à l'origine des désordres métaboliques que l'on constate avant le début des traitements [12, 13]. Deuxièmement, bien qu'ils soient nécessaires à la guérison, il a été démontré que les traitements de chimiothérapie et de radiothérapie sont susceptibles de favoriser l'apparition de maladies chroniques, telles que l'obésité, des altérations du métabolisme lipidique et glucidique et les maladies cardiovasculaires (MCV) [14, 15] par leur effet cardiotoxique et leur impact sur certaines hormones essentielles à la régulation métabolique [16], en plus de stimuler la réponse pro-oxydante et pro-inflammatoire de l'organisme [17]. D'ailleurs, l'inflammation de bas grade et le SO ont d'ailleurs été identifiés comme des mécanismes importants dans le développement de maladies chroniques dans la population générale [18]. Des évidences suggèrent également une association positive entre l'inflammation

et le SO chronique et des marqueurs importants de la progression des complications cardiométaboliques chez les survivants de cancer pédiatrique [19]. Quatrièmement, le microbiote intestinal joue un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie métabolique de l'hôte. Une perte de l'équilibre microbien peut entraîner des conséquences sur la santé cardiométabolique de l'individu par la création d'un environnement favorable à l'endotoxémie métabolique, soit la translocation des lipopolysaccharides (LPS), une endotoxine pro-inflammatoire, induisant une inflammation et un SO chronique [20]. La dysbiose intestinale a été associée à multiples reprises dans la littérature à l'obésité, à la RI et au diabète de type 2 (DBT2) [21, 22]. Ce débalancement serait également à l'origine d'une diminution de la production d'acides gras à chaînes courtes (AGCC), résultant de la fermentation des fibres non digestibles dans le côlon. Les AGCC remplissent différentes fonctions dans l'organisme. Localement, ils sont utilisés par les colonocytes comme source d'énergie, renforce la barrière intestinale, favorise l'homéostasie microbienne et ont des propriétés anti-inflammatoires [23]. Lorsqu'ils se retrouvent en périphérie, les AGCC stimulent la lipogenèse et la gluconéogenèse dans le foie et les muscles et le métabolisme énergétique en activant l'AMPK en plus d'améliorer la sensibilité à l'insuline [23].

Nos objectifs sont en premier lieu d'évaluer l'impact de la maladie seule et du méthotrexate (MTX) sur l'évolution du poids, de la dyslipidémie et de la RI au diagnostic, durant la phase à court terme et à long terme après les traitements de MTX. En deuxième lieu, nous nous sommes intéressés à la modulation du microbiote intestinal et au contenu d'AGCC dans les selles et aux différences sexuelles quant à la réponse métabolique aux différentes variables expérimentales.

Ce projet de recherche permettra d'approfondir nos connaissances et d'investiguer plus en détail les mécanismes impliqués dans le développement des complications cardiométaboliques chez les survivants de cancer pédiatrique, un sujet actuellement peu étudié. Par conséquent, une meilleure compréhension de l'étiologie des désordres cardiométaboliques à long terme procurera la possibilité d'assurer un suivi optimal, d'améliorer le pronostic, de perfectionner la

prévention et de stimuler la recherche de traitements alternatifs ou adjuvants des survivants de la LLA de l'enfant.

Chapitre 2 – Revue de littérature

2.1 Cancers pédiatriques

D'après les données populationnelles de 2019 publiées par Statistique Canada, les tumeurs malignes se situent au premier rang des causes de décès des enfants âgés entre 1 et 14 ans, suivi par les accidents et blessures involontaires [24]. Entre 2001 et 2020, le nombre de cas diagnostiqués chez les enfants canadiens de moins de 15 ans demeure assez stable et oscille entre 825 et 1020 cas par année [25], ce qui correspond à moins de 1% de tous les cancers répertoriés au pays [26, 27]. De façon générale, les types de cancers pédiatriques les plus prévalents sont les leucémies (autour de 35%), dont le type lymphoïde est le plus couramment diagnostiqué (26%) [28-30], les tumeurs du système nerveux central (SNC) (environ 18%) [30], les lymphomes (11%) [30], les neuroblastomes (8%) ainsi que les sarcomes des tissus mous (6%) [26]. Les garçons ainsi que les enfants en bas âge sont plus susceptibles de recevoir un diagnostic de cancer [26, 29-31]. Effectivement, le nombre de cancers répertoriés pour les enfants de moins de 5 ans est près de deux fois plus élevé que pour les enfants âgés de 5 à 14 ans [24].

2.2 Leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) de l'enfant

2.2.1 Physiopathologie et symptômes

La LLA est le cancer pédiatrique le plus commun, totalisant 75-85% des cas de leucémies chez l'enfant [2, 25, 32]. Au même titre que tous les autres cancers, l'incidence de ce type de leucémie est plus importante dans les 5 premières années de vie [33]. La LLA est un cancer hématologique qui évolue rapidement [33] et qui se caractérise par des anomalies de différenciation des cellules lymphoïdes matures [34], soient les lymphocytes T et B et les cellules Natural Killer (cellules NK). Ce blocage à un stade précoce de la différenciation de ces cellules entraîne une prolifération des blastes, qui correspondent à des cellules lymphoïdes non différenciées [34]. La **Figure 1** illustre ce phénomène. Cette production excessive engendre une accumulation et une infiltration de blastes dans la moelle osseuse, les voies sanguines et lymphatiques, le SNC ainsi que les testicules [32].

Cet envahissement des tissus affecte le bon fonctionnement du système hématopoïétique occasionnant de l’anémie, de la thrombocytopénie et de la neutropénie [33], contribuant à l’apparition de symptômes qui définissent la leucémie.

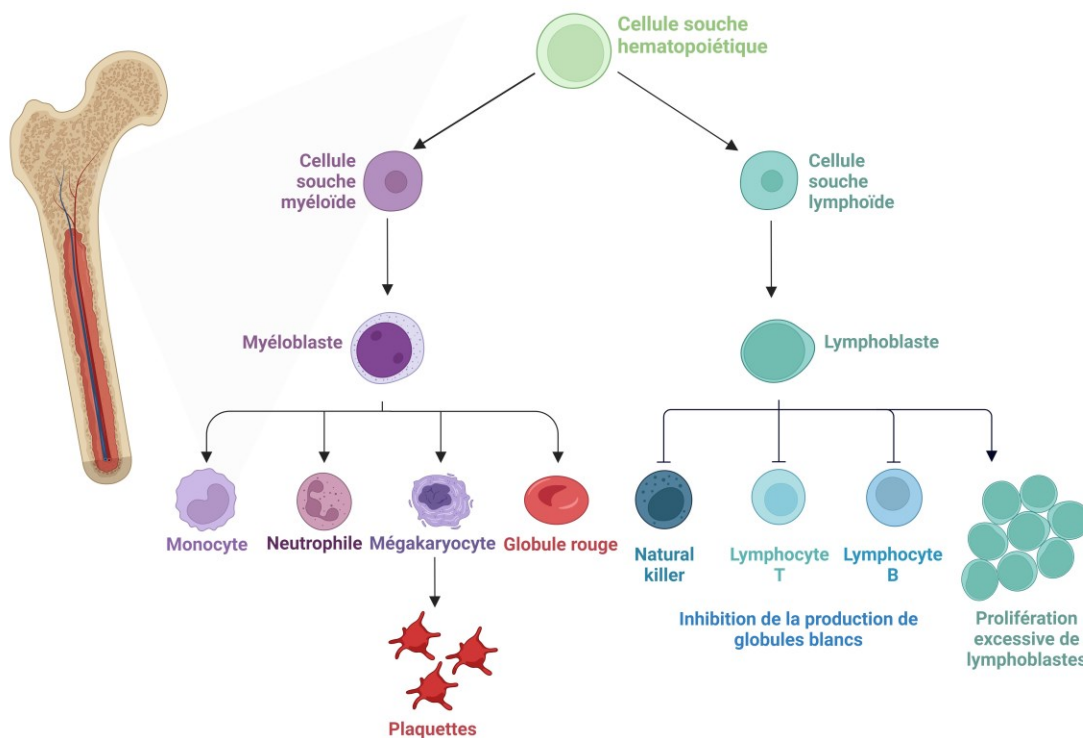


Figure 1. – Physiopathologie de la LLA (Créée avec Biorender.com)

Plusieurs symptômes physiques sont liés à la production excessive de lymphoblastes associée à la LLA pédiatrique et sont relatés ci-bas.

2.2.1.1 Infections

Les enfants atteints de la LLA peuvent présenter des symptômes généraux suggérant une infection, tels que de la fièvre ou des sueurs nocturnes [32]. Ces symptômes peuvent être engendrés par l’installation d’une pneumonie [35], d’une bactériémie [36] ou d’une infection

urinaire [37]. Effectivement, la prolifération excessive de lymphoblastes observée dans la physiopathologie de la LLA entraîne une inhibition de la production des cellules lymphoïdes matures et fonctionnelles, communément appelées globules blancs, jouant un rôle crucial dans le système immunitaire. Cela compromet la défense immunitaire et augmente le risque de développer des infections chez les enfants atteints de la LLA.

2.2.1.2 Pâleur, fatigue, anémie et dyspnée

De plus, la multiplication disproportionnée de blastes appauvrit la moelle osseuse en nutriments et en ressources pour produire les autres lignées de cellules sanguines, ce qui provoque une diminution de globules rouges dans la circulation systémique. Puisque les globules rouges ont pour fonction principale d'approvisionner le corps en oxygène, un moins grand nombre dans la circulation systémique peut entraîner des symptômes tels que la fatigue ou un état léthargique, des difficultés respiratoires et une pâleur de la peau.

2.2.1.3 Apparitions d'ecchymoses et saignements

Le dérèglement du système hématopoïétique en contexte de LLA engendre une inhibition de la production de toutes les lignées de cellules sanguines, incluant les plaquettes, au profit de la formation des cellules leucémiques. Les plaquettes sont impliquées dans la coagulation sanguine. Cette réduction de plaquette dans le sang, ou thrombocytopénie, engendre des difficultés de coagulation et peuvent s'exprimer par l'apparition d'ecchymoses et de saignements plus fréquents et plus abondants [38].

2.2.1.4 Douleurs osseuses

La multiplication incontrôlée de lymphoblastes crée une pression inhabituelle à l'intérieur de l'os. Cette pression est à l'origine des douleurs osseuses fréquemment observées au diagnostic de la LLA pédiatrique, localisées principalement au niveau des membres inférieurs et du dos [39]. Les enfants atteints de la LLA peuvent également présenter de l'ostéopénie, causée par une

formation et une minéralisation réduites des os, ce qui peut entraîner des fractures de tassement vertébrales [39, 40], des lésions ostéolytiques et de l'ostéoporose [38, 39].

2.2.1.5 Dépôt de lymphoblastes

Un enfant atteint de la LLA peut présenter des signes et symptômes suggérant une accumulation de lymphoblastes dans différentes structures corporelles. Parmi ces structures, on y retrouve les ganglions, faisant partie du système lymphatique. Les dépôts lymphocytaires amènent de l'enflure ganglionnaire, phénomène appelé lymphadénopathie [38]. L'élargissement des testicules peut également survenir chez les garçons souffrant de leucémie [1]. Dans certains cas, les enfants peuvent présenter des signes d'hépatosplénomégalie, une expansion du foie et de la rate [38]. Cet élargissement peut comprimer le système digestif et causer une inappétence, des nausées ou vomissements ou une perte de poids [38]. Spécifiquement dans les cas de leucémie de type T, le thymus peut augmenter en volume dû à l'accumulation de lymphoblastes [38], ce qui peut créer une pression sur les structures avoisinantes, telles que la trachée, l'œsophage et le système artériel et veineux. Finalement, les lymphoblastes sont susceptibles de se déposer au sein du SNC. La compression causée par cette accumulation peut se manifester par des maux de tête [1]. Une paralysie faciale idiopathique causée par l'infiltration du SNC par les cellules leucémiques a également été documentée dans quelques études de cas spécifiques [41-43]. Finalement, dans certains cas plus rares, une hypertrophie rénale est observée chez les patients atteints de la LLA [44, 45].

2.2.1.6 Hyperleucocytose

L'hyperleucocytose se caractérise par un nombre de globules blancs très élevés en circulation (> 100 000/ μ l) ce qui augmente la viscosité du sang et déclenche sa coagulation [38]. Cependant, ce symptôme est plus commun dans la leucémie myéloblastique aiguë (LMA). La LMA est un type de leucémie affectant la différenciation des cellules souches myéloïdes, à l'origine de certains types de globules blancs (monocytes et neutrophiles) et des cellules sanguines (globules rouges et

plaquettes). L'incidence de ce type de leucémie est moins grande que la LLA et constitue 15-20% des cas diagnostiqués chez les enfants [46, 47].

2.2.2 Types de LLA

Il existe deux types de LLA. Premièrement, la leucémie lymphoblastique de type B (B-LLA), affectant la lignée des lymphocytes de type B. Les lymphocytes B font partie de la famille des globules blancs lié au système immunitaire adaptatif, dont le rôle se résume par la production des anticorps. 85% des cas de LLA diagnostiqués sont de type B [48]. Deuxièmement, il y a la leucémie lymphoblastique de type T (T-LLA), entraînant une multiplication des précurseurs des lymphocytes de type T. Les lymphocytes T sont également impliqués dans l'immunité adaptative et se différencient en plusieurs types de cellules pour combattre les pathogènes. Contrairement à la B-LLA, les lymphoblastes de type T migrent vers le thymus, organe endocrinien associé au système lymphatique, et s'y accumulent. La T-LLA est plus rare, et représente environ 10-15% des cas diagnostiqués [48].

2.2.3 Diagnostic

Afin de diagnostiquer et classifier la LLA, plusieurs types d'examens sont réalisés. La **Figure 2** schématise ces tests.

2.2.3.1 Observation des signes cliniques

Un examen physique est effectué pour constater des signes et symptômes cliniques engendrés par la leucémie, mentionnés dans la section **2.2.1**.

2.2.3.2 Prélèvement sanguin

Dans la majorité des cas, la prolifération de blastes se reflète dans la circulation sanguine. L'étude du frottis sanguin permet d'examiner de manière qualitative les différentes classes de cellules sanguines et de témoigner des modulations dans leur proportion causée par la progression

cancéreuse. La production excessive de lymphoblastes limite l'espace disponible dans la moelle osseuse pour produire les autres composantes du sang. De ce fait, le sang leucémique contient moins de globules rouges, de plaquettes, de globules blancs matures et une présence massive de lymphoblastes.

2.2.3.3 Prélèvement de la moelle osseuse

Un prélèvement de moelle osseuse est nécessaire pour confirmer le diagnostic de LLA [1]. Effectivement, les manifestations physiques sont peu spécifiques et peuvent être causées par d'autres problèmes de santé, tels que la myélofibrose ou l'anémie. La LLA est diagnostiquée lorsque la biopsie de la moelle osseuse révèle plus de 20% de lymphoblastes [32].

2.2.3.4 Immunophénotypage

L'étude de la moelle osseuse permet également de déterminer le type de leucémie avec l'immunophénotypage lymphocytaire par cytométrie en flux [1]. Un test attestant la présence positive de désoxynucléotidyl transférase terminale (TDT+), un marqueur exprimé dans les lymphoblastes, confirme la LLA. De plus, l'absence de myéloperoxydase (MPO-), un marqueur de la présence de myéloblastes, confirme l'absence de LMA, un autre type de leucémie aiguë. Lorsque les tests pour différencier la LLA de la LMA sont réalisés et que la LLA est confirmée, d'autres marqueurs présents à la surface des lymphoblastes permettent de catégoriser le type de LLA. Pour la B-ALL, les marqueurs CD10+, CD19+ et CD20+, à la surface des lymphocytes B, sont généralement utilisés pour confirmer sa présence, alors que pour la T-LLA, les marqueurs CD2+ à CD8+, à la surface des lymphocytes T, confirment la présence de ce type de leucémie [49-51].

2.2.3.5 Génotypage

L'étude des gènes, incluant plusieurs techniques telles que le séquençage du génome entier (WGS), du transcriptome (RNA-seq), de l'exome entier (WES) et des gènes cibles [52], est une étape nécessaire dans le diagnostic de la leucémie, car certains désordres génétiques influencent

le traitement administré. La translocation 12 :21 se retrouve généralement plus fréquemment chez les enfants. Une autre mutation génétique commune est la translocation 9:22, touchant davantage les adultes, qui est souvent accompagnée de la fusion des gènes Breakpoint cluster region protein (*BCR*) et ABelson Leukemia (*ABL*). La mutation survient lorsque la portion du chromosome 9 contenant le gène *ABL* se détache et fusionne avec la partie du chromosome 22 contenant le gène *BCR*. Cette mutation génétique se nomme gène de fusion, ou communément appelé le chromosome de Philadelphie. Il est important de s'assurer de la présence ou absence de cette fusion, car contrairement aux autres sous-types de LLA, l'utilisation d'inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) est nécessaire à son traitement [1]. Un résumé des altérations génétiques et de leur impact sur le pronostic est présenté dans la section **2.2.4.5**.

2.2.3.6 Infiltration lymphocytaire

D'autres examens, tels que la tomодensitométrie, la résonance magnétique, l'échographie, la radiographie ou la ponction lombaire, sont effectués pour observer des masses ou des zones d'activité métabolique importantes reliées à l'infiltration de cellules leucémiques dans certains tissus. Les tissus susceptibles de présenter des infiltrations de lymphoblastes sont le SNC, le foie, la rate, les testicules et le thymus, spécifique à la T-LLA [1]. Ces tests sont complémentaires au diagnostic et servent essentiellement à voir l'étendue de la maladie et guider le choix des avenues thérapeutiques.

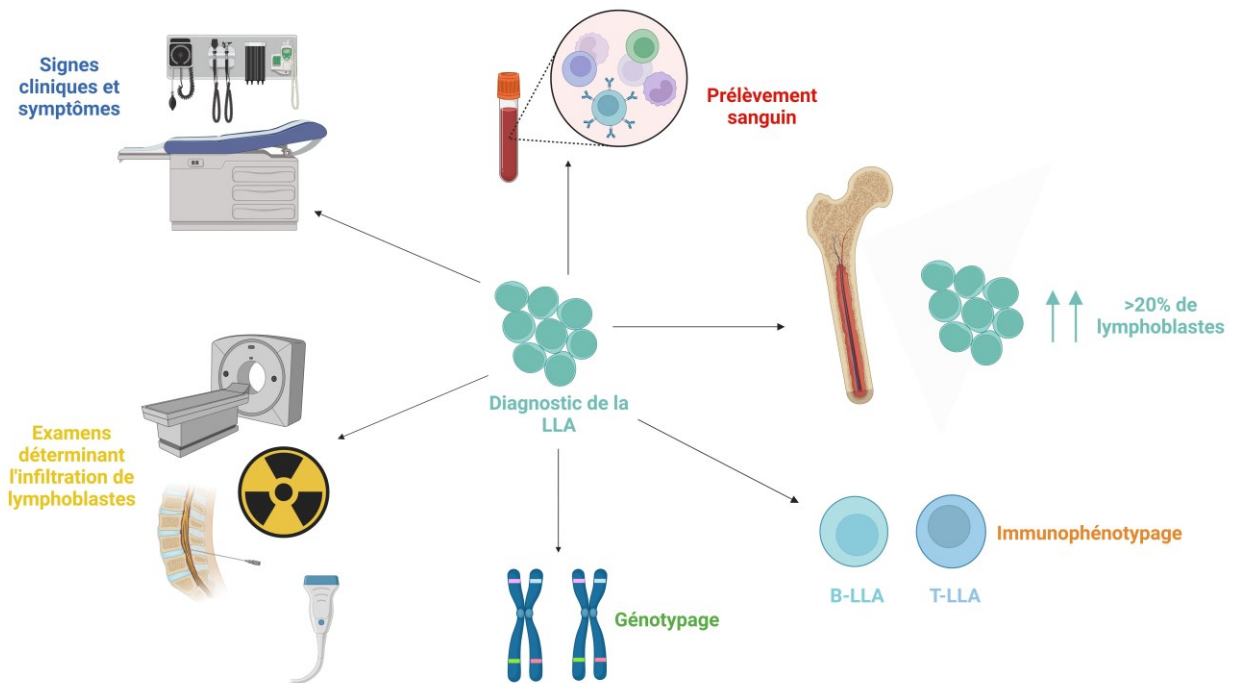


Figure 2. – Schématisation des tests effectués pour diagnostiquer la LLA (Créée avec Biorender.com)

2.2.4 Facteurs de risque et pronostic

2.2.4.1 Facteurs de risque de développer la LLA pédiatrique

Plusieurs facteurs ont été associés dans la littérature à un risque plus élevé de développer la LLA. Certains d’entre eux sont présentés ci-bas.

2.2.4.1.1 Condition génétique

Le syndrome de Down ainsi que des conditions plus rares, telles que le syndrome de Li-Fraumeni, la neurofibromatose, le syndrome de Klinefelter, l’anémie de Fanconi, le syndrome de Shwachman-Diamond, le syndrome de Bloom, le syndrome de rupture de Nijmegen et l’ataxie télangiectasique sont des facteurs de risque de la LLA [34, 53-55]. Ces conditions génétiques présentent des défauts dans la réparation de l’ADN favorisant l’apparition de mutations

oncogènes et ont été associées à des altérations épigénétiques contribuant au développement de la leucémie [56, 57].

2.2.4.1.2 Poids à la naissance

Une étude de cas-témoin ayant regroupé des données des États-Unis, du Royaume-Uni et de l'Allemagne comparant des enfants ayant la LLA et des enfants non malades a associé un poids élevé à la naissance (>4500 g) à une prévalence accrue de la maladie (20% de risque par kg d'augmentation du poids à l'accouchement) [58]. Cette relation a été établie dans plusieurs autres études [59-62].

2.2.4.1.3 Facteurs environnementaux

Certains facteurs environnementaux ont été associés au risque de développer la LLA. Parmi ceux-ci, on retrouve l'exposition aux pesticides [63], par contre, cette association demeure controversée [64]. Des liens entre la LLA pédiatrique et le contact avec certains produits chimiques (ex. le benzène) et la pollution atmosphérique ont été établis, mais les évidences restent discutables et plus de recherches sur le sujet sont nécessaires pour éclaircir le mécanisme contribuant à son apparition [64]. L'infection avec le virus T-lymphotrope humain (HTLV) est un rétrovirus oncogène dont les cas répertoriés se situent surtout au sud du Japon, dans la région des Caraïbes, en Amérique du Sud, l'Afrique intertropicale, le Moyen-Orient et des sous-groupes isolés de la Mélanésie. Entre 2 et 10% des personnes porteuses du virus développeront une maladie subséquente, dont la T-LLA [55, 65]. Enfin, l'exposition à des rayons ionisants augmente le risque de développer une tumeur maligne [55, 63, 64, 66].

2.2.4.2 Facteurs de risque de rechute et mauvais pronostic

Certaines caractéristiques au diagnostic de la LLA pédiatrique ont été identifiées à une résistance au traitement à un mauvais pronostic. L'identification de ces facteurs a permis de stratifier le

niveau de risque de rechute des patients et d'adapter les traitements dans le but d'améliorer leur survie. Ces facteurs sont énumérés dans le **Tableau 1**.

2.2.4.2.1 Âge au diagnostic

L'âge au diagnostic est un facteur important dans le pronostic. Un diagnostic de leucémie avant 1 an et après 10 ans est associé à un pronostic plus sombre que s'il survient entre 1 an et 10 ans [34, 53, 54, 67, 68]. Ces tranches d'âge ont une prévalence plus élevée de mutations génétiques avec des issues cliniques plus sombres [34].

2.2.4.2.2 Nombre de globules blancs en circulation

Un nombre élevé de leucocytes en circulation au diagnostic ($>50\,000$ cellules/mm³) est associé à un risque plus élevé de rechute [34, 53, 54, 67, 68]. Comme l'âge au diagnostic, cet élément est souvent retrouvé dans des mutations génétiques dont le pronostic est moins favorable [53].

2.2.4.2.3 Infiltration de lymphoblastes

Une infiltration de lymphoblastes dans le SNC est prédictive d'un pronostic plus sombre [53], car la présence de la maladie dans le cerveau et/ou la moelle épinière témoigne d'une maladie à un stade avancé, nécessitant des traitements supplémentaires et ciblés, comme la radiothérapie crânienne [69].

2.2.4.2.4 Immunophénotype

Anciennement, la leucémie de la lignée des cellules T avait un pronostic plus négatif que les leucémies de type B [70]. D'ailleurs, un sous-type de la T-LLA, la *Early T-cell precursor ALL (ETP)*, qui se caractérise par des thymocytes immatures ayant la capacité de se différencier en lymphoblastes ou en myéloblastes, est associé à un risque de rechute plus élevé. Avec l'avancée des traitements, la survie s'est améliorée et se compare à celle de la B-LLA [34, 48, 53, 68].

Cependant, la survie suivant une rechute est nettement moindre chez les enfants atteints de la T-LLA lorsque comparée à celle des enfants atteints de la B-LLA [71]. Malheureusement, le mécanisme expliquant cela n'est pas connu.

2.2.4.2.5 Anomalies associées au nombre de chromosomes

La LLA est fréquemment le produit d'anomalies chromosomiques. Chacune de ces altérations peut influencer le pronostic de la maladie. L'hyperdiploïdie (>50 chromosomes), rencontrée dans 20-30% des cas de LLA pédiatrique est plutôt favorable, tandis que l'hypoploïdie (31-39 chromosomes), l'haploïdie (24-30 chromosomes) et l'amplification intrachromosomique du chromosome 21 (iAMP21) correspondent à un pronostic plutôt défavorable [32, 34, 48, 53, 67, 68].

2.2.4.2.6 Mutations génétiques

Parmi les mutations génétiques observées en contexte de LLA, les translocations *ETV6–RUNX1* ([t(12;21)(q13;q22)]) et *TCF3–PBX1* ([t(1;19)(q23;p13)]), les dérégulations *TLX1* et du gène *DUX4* et du facteur de transcription *ERG*, les réarrangements *NUTM1*, les mutations *NOTCH1* et *FBXW7* sont généralement liés à un meilleur pronostic. À l'opposé, le variant *TCF3–HLF* de la translocation [t(1;19)(q23;p13)], le chromosome de Philadelphie (*BCR–ABL1* [t(9;22)(q34;q11)]), le Philadelphie-like (altérations *IKZF1* +, absence de la fusion *BCR–ABL1*), les altérations de l'activation des kinases *ABL1*, *ABL2*, *CRLF2*, *EPOR*, *JAK2*, *PDGFRB*, les réarrangements des gènes *MLL*, *MEF2D* et *ZNFF384*, les dérégulations *TLX3*, *LMO2* et *LYL1*, et les mutations ou délétions du facteur de transcription *IKZF1* et *PAX5alt* sont associés à un pronostic plus sombre [32, 34, 48, 53, 67, 68]. L'étude des gènes a permis de découvrir que certaines altérations génétiques sont associées à une réponse moindre au traitement et à un plus grand risque de rechute [72].

2.2.4.2.7 Évaluation de la maladie résiduelle

Les enfants présentant des signes de maladie résiduelle, correspondant à la présence de blastes dans la moelle osseuse après la première phase de chimiothérapie, la phase d'induction, ont généralement un moins bon pronostic et un risque plus élevé de rechute [34, 53, 54, 66-68].

2.2.4.2.8 Ethnicité et statut socio-économique

Le pronostic de la LLA varie selon l'ethnicité. Effectivement, de meilleures chances de survie sont observées dans les communautés caucasienne et asiatique, contrairement aux patients d'origine hispaniques et afro-américains [34, 73, 74]. Plusieurs facteurs peuvent contribuer à ces différences, telles que les mutations génétiques ayant des effets défavorables sur le pronostic dont la proportion est plus importante dans certains groupes ethniques [75, 76], un faible statut socio-économique et la compliance au traitement, surtout durant la phase de maintenance [53, 68, 77, 78].

Tableau 1. – Facteurs de risque de rechute et éléments influençant le pronostic de la LLA pédiatrique.

	Favorables	Défavorables
Âge	1-10 ans	< 1 an et > 10 ans
Nombre de leucocytes circulants		> 50 000 cellules/mm ³
Infiltration de lymphoblastes		SNC
Immunophénotype	Type B	Type T/ETP
Cytogénétique		
Syndrome		Syndrome Down Syndrome de Li-Fraumeni Neurofibromatose Syndrome de Klinefelter Anémie de Fanconi Syndrome de Shwachman-Diamond Syndrome de Bloom

		Syndrome de rupture de Nijmegen Ataxie télangiectasique
Ploïdie	Hyperploïdie (>50 chromosomes)	Hypoploïdie (31-39 chromosomes) Haploïdie (24-30 chromosomes) iAMP21
Mutations génétiques	Translocations ETV6–RUNX1, TCF3–PBX1 Dérégulations TLX1, DUX4-ERG Réarrangement NUTM1 Mutations NOTCH1, FBXW7	Translocation TCF3-HLF, chromosome de Philadelphie, Philadelphie-like Altérations des kinases ABL1, ABL2, CRLF2, EPOR, JAK2, PDGFRB Dérégulations TLX3, LMO2, LYL1, Réarrangements MLL, MEF2D, ZNFF384 Mutations ou délétions IKZF1, PAX5alt
Ethnicité	Caucasiens et Asiatiques	Africains et Hispaniques
Statut socio-économique		Faible
Compliance au traitement		Mauvaise
Maladie résiduelle	Minimale	Élevée
Facteurs environnementaux		Rayons ionisants HTLV

2.2.5 Taux de survie

Le taux de survie de la LLA pédiatrique s’est grandement amélioré dans les dernières décennies. Effectivement, une étude menée aux États-Unis a analysé des données d’incidence, de mortalité et de survie entre 1975 et 2010 provenant de deux larges bases de données américaines (SEER et NAACCR). Le programme SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results) est une base de données sur l’incidence de cancer dans la population américaine et le registre NAACCR (North American Association of Central Cancer Registries) est un regroupement de plusieurs bases de

données sur l'incidence de cancer, couvrant une grande majorité de la population américaine. Ces données démontrent que la survie à 5 ans des enfants atteints de la LLA pédiatrique a positivement évolué, passant de 57% entre 1975 et 1979 à 90% entre 2003-2009 [29]. Parmi les cas diagnostiqués entre 1991 et 2000, la survie à 5 ans était de plus de 80%, 79% à 10 ans et 78% à 15 ans [29]. En ce qui concerne les données canadiennes disponibles entre 2013 et 2017, on observe une survie au-delà de 90%, que ce soit à 1 an, à 3 ans, à 5 ans et à 10 ans, pour les leucémies de type lymphoïdes [28]. De plus, les enfants ayant été diagnostiqués avant l'âge de 10 ans présentaient un meilleur taux de survie comparativement à ceux ayant reçu un diagnostic dans la tranche d'âge 10-14 ans [28].

2.2.6 Traitements de la LLA

Cette section porte sur les différentes composantes constituant les traitements de la LLA, soit les phases de traitement, les agents chimiothérapeutiques employés et leurs mécanismes d'action (**Figure 3**) ainsi que les types de thérapies utilisées (**Figure 4**).

2.2.6.1 Phases de traitement

2.2.6.1.1 Induction

La phase d'induction est la première phase du traitement de chimiothérapie pour la LLA pédiatrique, visant à induire une rémission, soit le retour à un système hématopoïétique normal. Cette étape dure entre 4 et 6 semaines. Plusieurs molécules sont utilisées au cours de l'induction, incluant des glucocorticostéroïdes (dexaméthasone ou la prednisone), les asparaginases (L-asparaginase ou pégaspargase), les alcaloïdes (vincristine) avec ou sans des anthracyclines (daunorubicine ou la doxorubicine) [32, 53].

2.2.6.1.2 Consolidation/intensification

La deuxième phase de la chimiothérapie est la consolidation, ayant pour objectif d'éliminer les cellules tumorales restantes pouvant être responsables d'une rechute. Cette période peut durer jusqu'à 8 mois. Les agents impliqués durant la consolidation/intensification sont : la cyclophosphamide, la 6-mercaptopurine, la cytarabine, la thioguanine et le MTX à forte dose, la vincristine, les corticostéroïdes et la L-asparaginase/pégaspargase. La consolidation est suivie par une période de réinduction, ou période d'intensification, dans laquelle les médicaments précédemment mentionnés sont réutilisés pour réduire l'incidence de rechute autant chez les enfants à haut risque que chez ceux à risque standard [32, 53]. Le risque de rechute pendant les traitements est classifié selon l'évaluation de la maladie résiduelle minime (MRM) ainsi que le risque initial associé au type de leucémie et aux facteurs influençant le pronostic, tels que mentionnés à la section **2.2.4**. La MRM se caractérise par la mesure de blastes dans la moelle osseuse et est un puissant indicateur de la réponse au traitement. Le seuil distingue un risque standard à un risque élevé de rechute correspond à une MRM $\geq 0.01\%$ post-induction. Un risque élevé ou très élevée est considéré lorsque la maladie résiduelle post-induction est détectable et/ou persistance à la suite des autres phases de chimiothérapie ($\geq 0.1\%$) [32].

2.2.6.1.3 Maintien

La phase de maintien est la dernière et la plus longue phase du traitement de chimiothérapie systémique et peut durer jusqu'à 3 ans. Similaire à la phase de consolidation/intensification, le but du maintien est de se débarrasser de toute trace de maladie résiduelle. Les patients reçoivent une dose quotidienne de mercaptopurine et une dose hebdomadaire de MTX, avec ou sans vincristine et glucocorticostéroïdes [32, 53].

2.2.7 Classification des agents chimiothérapeutiques et mécanismes d'action

2.2.7.1 Anthracyclines

Les anthracyclines (doxorubicine, daunorubicine) font partie d'une famille de médicaments dont l'action est non spécifique au cycle cellulaire. Précisément, les anthracyclines se positionnent entre les paires de bases nucléiques constituant les 2 brins d'ADN [79]. Cette interférence crée un blocage de l'activité enzymatique de l'ADN-topoisomérase II, incapable de remplir son rôle de cliver l'ADN pour assurer sa transcription, sa réplication et sa réparation [80, 81].

2.2.7.2 Antimétabolites

Les antimétabolites (MTX, cytarabine, 6-mercaptopurine, 6-thioguanine) sont également une catégorie d'agents chimiothérapeutiques non spécifiques au cycle cellulaire. Ils agissent comme analogues des bases puriques et pyrimidiques ou en tant qu'antagonistes du folate [82]. Leur objectif commun est de limiter la synthèse de nucléotides, essentielle à la formation de l'ADN [83]. D'un côté, les analogues des bases puriques et pyrimidiques compétitionnent avec celles-ci et entraînent la formation d'ADN anormal. D'un autre côté, les antagonistes du folate, plus précisément le MTX, empêchent la dihydrofolate réductase (DHR) de remplir son rôle dans la production de tétrahydrofolate (forme active de l'acide folique), composé primordial dans la formation des purines [81].

2.2.7.3 Alkylants

Les alkylants ou les molécules dérivées du platine (cyclophosphamide, Carmustine, Lomustine, Chlorambucil, Melphalan, Ifosfamide) sont de puissants agents chimiothérapeutiques démontrant une grande affinité pour l'ADN. L'alkylation de l'ADN endommage la structure du matériel génétique et des aberrations au niveau de la division cellulaire sont alors observées [84].

2.2.7.4 Alcaloïdes

Les alcaloïdes (vincristine) sont des molécules dérivées de plantes. Notamment, la vincristine est extraite de la *Catharanthus roseus*, communément appelée la pervenche de Madagascar. Ces agents s'attachent à la β -tubuline, impliquée dans la polymérisation des microtubules. Cette liaison limite la génération des microtubules, dont la fonction est indispensable au processus d'alignement et de séparation chromosomique au cours de la mitose [81]. Ultimement, la réplication des cellules leucémiques est mise en péril.

2.2.7.5 Asparaginases

Les agents chimiothérapeutiques de la classe des asparaginases (L-asparaginase, pégaspargase) proviennent de la production bactérienne de deux souches de bactéries, *Escherichia coli* et *Erwinia chrysanthemi*. Les asparaginases accélèrent l'hydrolyse de la L-asparagine en acide aspartique et en ammoniac. Cette action a pour effet d'appauvrir le milieu de cet acide aminé essentiel pour la fabrication protéique. De plus, contrairement aux cellules saines, les cellules cancéreuses sont déficientes en asparagine synthétase, enzyme dont la fonction est de réguler l'épuisement en L-asparagine. Cette double action induit une carence de cet acide aminé et entraîne l'apoptose [81].

2.2.7.6 Corticostéroïdes

Les corticostéroïdes (dexaméthasone, prednisone) exercent leur action cytotoxique par leur liaison aux récepteurs de glucocorticoïdes (RG), présents dans l'espace cytoplasmique. Ceci déclenche l'homodimérisation des RG pour permettre leur translocation nucléaire, dans lequel deux actions sont possibles. D'une part, le dimère de RG peut interagir avec des éléments de réponse aux glucocorticoïdes (ERG) visant à stimuler la transcription génique de gènes stimulant la synthèse de protéines anti-inflammatoires, notamment l'Annexine 1, l'inhibiteur du facteur nucléaire κB (I κB - α), la protéine kinase phosphatase 1 activée par les mitogènes (MKP-1), l'inhibiteur de la leucoprotéase sécrétoire (SLPI) et la protéine *glucocorticoid-induced leucine zipper* (GILZ) [85]. D'une autre part, les monomères de RG peuvent engendrer la répression de

certaines facteurs de transcription tels que la protéine activatrice-1 (AP-1) et le facteur nucléaire- κ B (NF- κ B). Les deux mécanismes d'action réduisent la production de cytokines, inhibent l'expression génique de plusieurs oncogènes et provoquent l'arrêt du cycle cellulaire, menant ainsi à la mort de la cellule tumorale [81, 86].

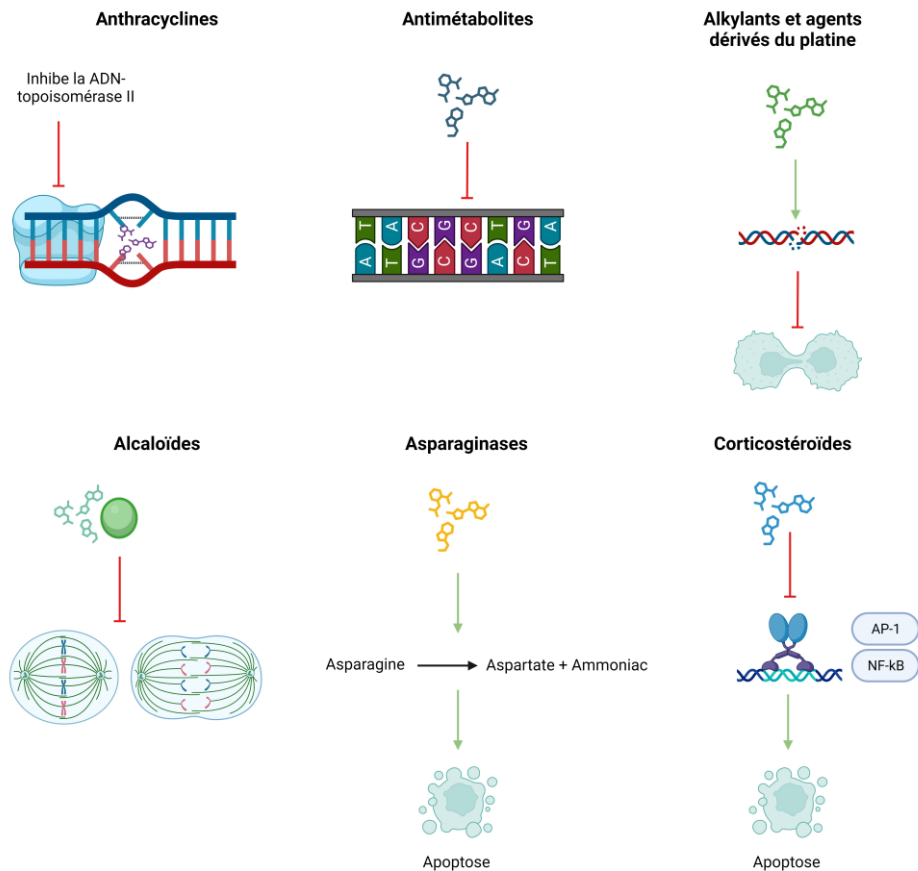


Figure 3. – Mécanismes d'action des différentes classes agents utilisées dans le traitement chimiothérapeutique de la LLA pédiatrique (Créée avec Biorender.com)

2.2.8 Chimiothérapie intrathécale

La chimiothérapie intrathécale se définit par la médication administrée directement dans l'espace contenant le liquide céphalo-rachidien. Effectivement, la chimiothérapie systémique est

généralement peu efficace pour atteindre le SNC. Cette technique sert donc à outrepasser la barrière hématoencéphalique et traiter ou prévenir les atteintes du SNC. Le MTX, la cytarabine et les glucocorticoïdes (ex. dexaméthasone) sont habituellement utilisés pour ce type de chimiothérapie et démontrent une meilleure efficacité lorsqu'utilisés conjointement. Celle-ci peut débuter en parallèle à la phase d'induction et se poursuivre jusqu'à la conclusion du traitement systémique [32].

2.2.9 Radiothérapie

L'irradiation est une autre méthode employée pour mener à la réduction des cellules leucémiques dans le corps. Elle consiste à utiliser des rayons pour cibler et endommager l'ADN des cellules d'intérêt et mener à l'apoptose cellulaire et empêcher leur multiplication. Anciennement, la radiation crânienne en prophylaxie pour éviter les atteintes du SNC faisait partie intégrante du protocole de traitement dans les cas de LLA. De nos jours, elle est plutôt omise en raison de ses effets néfastes sur la santé à long terme des survivants. D'ailleurs, plusieurs études cliniques ont démontré que l'utilisation de la chimiothérapie intrathécale sans avoir recours à l'irradiation crânienne avait une efficacité similaire à la radiothérapie et qu'elle s'avère être un traitement de remplacement à celle-ci [87, 88]. Les néoplasmes secondaires [89], des difficultés neurocognitives [16, 87], une dysfonction endocrinienne [16, 90], une augmentation de microsaignements cérébraux [91] et un risque accru de mortalité [92] font partie des effets indésirables associés à la radiothérapie crânienne (RTC). Cependant, elle peut encore être utilisée dans certains cas, par exemple pour les cas de leucémie considérés à haut risque (atteinte du SNC ou des testicules, T-LLA) [54, 93]. Elle peut également être utilisée dans la préparation à la transplantation de cellules souches hématopoïétiques fin d'éradiquer un maximum de cellules malignes et favoriser le succès de la greffe [93, 94].

2.2.10 Thérapies avancées

2.2.10.1 Immunothérapie

L'immunothérapie se trouve parmi les thérapies avancées proposées en situation de maladie résistante aux traitements traditionnels ou récidivante. Cette récente approche vise à stimuler la réponse immunitaire afin de lutter contre le cancer. Pour ce faire, différentes molécules servent à guider les globules blancs vers les cellules malignes et les reconnaître comme étant une menace pour l'organisme. Le blinatumomab est un anticorps bispécifique (BiTE: bi-specific T cell engager) qui se lie à la fois au CD3 du complexe TCR (CD3/T cell receptor) à la surface dans les lymphocytes T matures et au CD19 exprimé spécifiquement sur la membrane des lymphoblastes de type B [53]. Cette liaison favorise la formation d'une synapse cytolytique permettant la libération de perforine et de granzymes, menant à l'apoptose de la cellule tumorale via l'activation des caspases [95, 96]. L'inotuzumab ozogamicine est un anticorps monoclonal spécifique au marqueur CD22 exprimé sur les lymphocytes de type B et conjugué à la calichéamicine. Après la liaison avec le marqueur CD22, le complexe est ensuite internalisé dans la cellule leucémique, où la calichéamicine, un antibiotique antitumoral dont le mode d'action est de cliver l'ADN, provoque la mort cellulaire [53, 96]. Le tisagenlecleucel et le brexucabtagene autoleucel sont des thérapies utilisant les lymphocytes T ayant subi une modification génétique dans l'objectif d'obtenir des récepteurs antigéniques chimériques (CAR-T), permettant la reconnaissance spécifique des marqueurs CD19 sur la surface les lymphoblastes de la lignée B et ainsi contribuer à leur destruction [53, 96].

2.2.10.2 Inhibiteurs de tyrosine kinase

Les ITK sont spécifiquement utilisés dans le traitement d'un sous-type la LLA présentant l'anomalie chromosomique t(9 :22), soit le chromosome de Philadelphie. Cette mutation stimule la synthèse protéique d'ABL1 tyrosine kinase activée, favorisant la division et la croissance des cellules leucémiques. Cette classe de médicaments empêche l'action de l'ABL1 tyrosine kinase et de ce fait la progression tumorale [97, 98]. Le mésylate d'imatinib, le dasatinib et le ponatinib sont des exemples d'agents disponibles sur le marché [53].

2.2.10.3 Transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétique

La greffe de cellules souches hématopoïétique (GCSH) est une thérapie de dernier recours et est recommandée chez les patients à haut risque de rechute, telle que les sous-types de leucémies présentant un phénotype relié à une issue clinique défavorable, par exemple la leucémie de chromosome de Philadelphie positive ou ceux présentant des signes de maladie réfractaire à la suite des phases d'induction ou de consolidation. Pour augmenter les chances de succès de la greffe, un protocole de chimiothérapie avec ou sans radiothérapie est administré au patient pour supprimer un maximum de globules blancs et de lymphoblastes. Ensuite, un prélèvement de cellules souches est effectué dans la moelle osseuse, dans la circulation sanguine ou provenant du cordon ombilical d'un donneur compatible est injecté au receveur afin de reprogrammer le système hématopoïétique afin de normaliser la production des cellules sanguines [32, 99].

2.2.11 Gestion des complications durant le traitement

Plusieurs complications peuvent survenir pendant les traitements. De ce fait, différentes options sont disponibles pour éviter qu'elles s'aggravent et ainsi réduire le risque de mortalité. Parmi les soins de support, on y retrouve la transfusion sanguine, administrée si le patient souffre d'anémie ou de thrombocytopénie, symptômes courants de la LLA et les antibiotiques sont utilisés dans la prévention ou le traitement des infections [100]. Finalement, le syndrome de la lyse tumorale est une complication sérieuse qui peut potentiellement mettre la vie du patient en danger si un contrôle adéquat n'est pas mis en place. Il se manifeste lorsque les traitements entraînent l'apoptose des cellules leucémiques. Celles-ci déversent leur contenu dans l'espace extracellulaire et augmentent considérablement le taux d'acide urique, de phosphore, de potassium et diminuent le taux de calcium dans la circulation sanguine. Une hydratation adéquate, du bicarbonate de sodium intraveineux, de l'allopurinol et de la rasburicase sont des agents inhibant la production de ces composés ou favorisant leur excrétion [101].

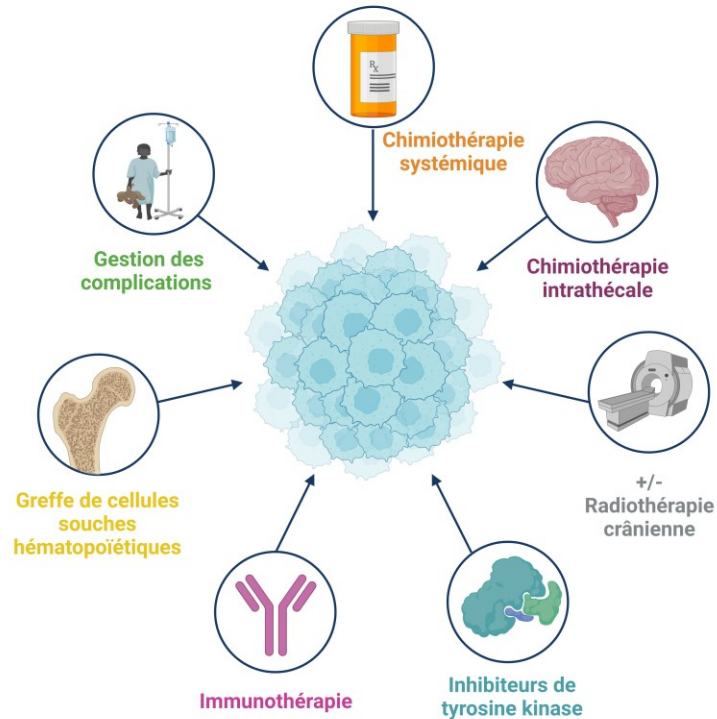


Figure 4. – Schématisation des traitements de la LLA (Créée avec Biorender.com)

2.3 Complications associées à la LLA et mécanismes proposés

2.3.1 Complications cardiométaboliques au diagnostic

La LLA seule semble provoquer des désordres métaboliques observables au diagnostic. Dans une étude de cas, une pression artérielle élevée a été constatée au moment des tests physiques visant à diagnostiquer la LLA chez un garçon de 3 ans [44]. Dans le même ordre d'idées, une étude rétrospective ayant enrôlé 77 patients nouvellement diagnostiqués avec la LLA pédiatrique a noté que 66% d'entre eux présentaient une pression artérielle élevée ou de l'hypertension avant le début des traitements [7]. Par ailleurs, une étude rétrospective incluant 222 patients atteints de la LLA est arrivée à la même conclusion, avec une incidence non négligeable d'hypertension, soit presque la moitié des participants (45,6%) [102].

On constate aussi une altération du métabolisme des lipides au diagnostic de la LLA de l'enfant. Une équipe de chercheurs du Danemark s'est penchée sur la question et a observé une grande prévalence de dyslipidémie, soit la quasi-totalité (99%) des enfants de la cohorte (112 patients avec LLA) [103]. Parmi ces perturbations, on retrouve l'hypertriglycéridémie, de faibles niveaux de cholestérol lié aux lipoprotéines à haute densité (HDL-c) et de l'apolipoprotéine A1 (Apo-A1) et des taux élevés de cholestérol lié aux lipoprotéines à faible densité (LDL-c) [6, 103-105].

L'incidence de surpoids et d'obésité au diagnostic est aussi considérable. Effectivement, selon les études, entre 8% et 53% des enfants ayant un cancer sont en situation de surpoids ou d'obésité avant le début des traitements [106-111]. Puisque le lien entre le surpoids au diagnostic et le risque de rechute et de survie réduite à 5 ans a été établi [108, 109], ce facteur de risque nécessite une attention particulière.

Peu de données sont disponibles actuellement en ce qui concerne le profil glycémique au diagnostic, mais une étude menée en 2023 a révélé qu'environ 6% des 220 patients inclus dans la cohorte présentaient une glycémie élevée avant tout traitement [5].

2.3.2 Complications aiguës pendant les traitements et à court-terme après les traitements

Des problèmes de santé peuvent survenir durant les traitements ainsi que peu de temps après que la rémission soit confirmée (< 5 ans). Parmi ces complications, on retrouve les infections, les problèmes gastro-intestinaux (mucosites, pancréatite, hépatite toxique), neurologiques (encéphalopathie, convulsion, aphasie, neuropathie), endocriniens (hypothyroïdisme) et osseux (ostéopénie, fracture) [112-118], mais aussi les désordres cardiométaboliques. En effet, *Kourti et al.* ont constaté que plus de la moitié des participants d'une cohorte de 52 jeunes survivants de la LLA (âge médian : 15.2 ans, durée médiane post-traitement: 3 ans post-traitement) présentait au moins une complication métabolique incluse dans la définition du SM [119]. *Nirmal et al.* ont

constaté que dans un échantillon de 277 jeunes survivants de la LLA de l'enfant (âge moyen : 13.1 ans, temps moyen post-traitement: 5.4 ans), 49.8% d'entre eux avaient au moins une composante du SM et 19.5% avaient deux composantes ou davantage [3].

Plus particulièrement, on observe une augmentation de l'incidence du surpoids et de l'obésité durant les différentes phases de traitements en comparaison aux mesures prises au diagnostic [107, 120]. Cette problématique perdure plusieurs années après la fin des traitements (entre 2 et 5 ans post-traitement) [111, 121], et afflige surtout chez les filles [121, 122]. De plus, des équipes de chercheurs s'intéressant aux changements d'indice de masse corporelle (IMC) ont observé que la prévalence du surpoids et de l'obésité chez les sujets augmente durant la phase d'induction et au début de la phase d'intensification/consolidation, diminue au début de la phase de maintenance et augmente à nouveau de façon progressive durant la première année de la phase de maintenance et demeure élevé au terme de la thérapie [106, 120].

L'hypertension est également une complication courante durant et après les traitements. Une étude rétrospective publiée en 2018 incluant 208 enfants atteints de la LLA a noté que, dès les premiers jours de la phase d'induction, 29% d'entre eux souffraient d'hypertension et que ce taux était diminué à 17% durant la phase d'intensification [123]. Il a été démontré qu'en moyenne 2 ans après la fin des traitements, les jeunes survivants de la LLA ont une pression systolique moyenne supérieure à un groupe contrôle, apparié selon l'âge et le sexe (105.5 vs. 95.5 mm Hg) [124]. De plus, une altération des marqueurs de la fonction endothéliale des vaisseaux sanguins a été observée chez les jeunes survivants, les prédisposant au développement de MCV [124].

Les traitements ont un impact négatif sur le profil lipidique des enfants atteints de la LLA et des jeunes survivants. Effectivement, environ 2 ans après la fin des traitements, *Giordano et al.* ont démontré que les jeunes survivants de la LLA pédiatrique présentaient des niveaux à jeun de cholestérol total (CT) (150.7 vs. 126.4 mg/dL), de LDL-c (86.4 vs. 59.8 mg/dL), de triglycérides (TG)

(68.4 vs. 48.2 mg/dL) plus élevés en plus de présenter des niveaux inférieurs de HDL-c (50.6 vs. 58.9) en comparaison avec des sujets sains, appariés selon l'âge et le sexe [124]. Le même portrait est observé lorsque le profil lipidique des enfants cancéreux au diagnostic et après les traitements est mis en relation. Une étude prospective menée sur 64 patients avec la LLA a montré que, malgré une amélioration du profil lipidique grâce à la chimiothérapie, une proportion importante de ces enfants présentent encore des anomalies au niveau des lipides sanguins à la fin de la chimiothérapie, se caractérisant par des taux sanguins à jeun de LDL-c (56%), de CT (29%) et de TG (70%) élevés et des niveaux de HDL-c bas (45%) [6]. Donc, on constate que les traitements affectent le profil lipidique des enfants avec la LLA et que ces effets demeurent présents à la fin des traitements. D'ailleurs, la relation entre l'exposition à l'asparaginase et l'incidence de l'hypertriglycéridémie et de l'hypercholestérolémie durant les traitements a été établie à plusieurs reprises dans la littérature [104, 113, 125, 126].

De plus, l'utilisation d'insuline pour traiter une hyperglycémie transitoire ou l'apparition d'un diabète durant les traitements est bien documenté [5, 10, 127-131]. L'asparaginase et les corticostéroïdes utilisés dans le traitement de la LLA pédiatrique pourraient être à l'origine de ces complications [10, 14]. Il a été montré dans une étude que les jeunes survivants ont une glycémie à jeun plus élevée que des contrôles appariés selon l'âge et le sexe (4.6 vs 4.3 mmol/L), environ 2 ans post-traitement [124]. Également, dans une cohorte de 44 survivants de la LLA pédiatrique (âge médian: 11.5 ans, temps moyen post-diagnostic: 5.4 ans) 17% d'entre eux avaient une glycémie à jeun élevée et 27% présentaient une résistance à l'insuline estimée [111]. Toutefois, des prévalences similaires ont été trouvées chez les membres de famille des participants (fratrie et parents) [111].

2.3.3 Complications cardiométaboliques à long-terme

Les survivants de cancer pédiatrique sont plus à risque de développer des maladies chroniques lorsqu'ils atteignent l'âge adulte. En effet, il a été démontré que les survivants de la LLA pédiatrique (âge médian : 26 ans, temps moyen post-diagnostic : 21.2 ans), sont 3,7 fois plus

susceptibles de souffrir d'une maladie chronique sévère ou potentiellement mortelle et 2,8 fois plus à risque d'en développer plusieurs en comparaison avec leur fratrie [132]. Cela inclut des problèmes musculosquelettiques (remplacement d'une articulation), neurologiques (paralysie ou déficits cognitifs), et cardiaques, par exemple l'insuffisance cardiaque congestive, les dysfonctions valvulaires, les maladies affectant le péricarde, les accidents vasculaires cérébraux ainsi que les maladies coronariennes (âge médian : entre 26 et 27 ans, temps médian post-diagnostic : entre 13 et 21.2 ans) [132, 133]. Par ailleurs, *Oeffinger et al.* ont observé que 62% des participants d'une cohorte de survivants de cancer pédiatrique (âge médian: 20.9 ans, temps médian post-traitement : 13.3 ans) souffraient d'au moins un facteur de risque cardiovasculaire [134]. Il a également été observé une autre étude comprenant 10 397 survivants de cancer pédiatrique (âge moyen : 26.6 ans, temps moyen post-diagnostic : 17.5 ans) que les femmes survivantes sont 1,5 fois plus à risque de développer une ou plusieurs conditions chroniques sérieuses que les hommes [11].

L'étude PETALE (*Prévenir les effets tardifs des traitements de la leucémie aiguë lymphoblastique chez l'enfant*), visant à évaluer l'incidence des complications cardiométaboliques chez les survivants de la LLA pédiatrique, a été menée par notre équipe de recherche. La cohorte comprenait 247 survivants (âge médian: 21.7 ans, temps moyen post-diagnostic: 15.5 ans). Il a été montré que, chez les survivants adultes, 56% étaient en situation de surpoids ou d'obésité, 13% souffraient de pré ou d'hypertension, 4% présentent du prédiabète et 48% étaient dyslipidémiques [4]. Chez les femmes, davantage de surpoids et d'obésité (71% vs 41% des hommes) et de prédiabète (6% vs 2.5% des hommes) ont été identifiés tandis que les hommes étaient plus nombreux à présenter de la pré- ou de l'hypertension (20% vs 6% des femmes) [4]. Par la suite, il a été mis en évidence que plus du quart de la cohorte de survivants adultes présentaient au moins 2 facteurs de risque cardiométabolique et qu'environ 10% avaient un SM [4]. Finalement, comparativement à la population générale canadienne, les survivants de la cohorte PETALE présentaient un risque accru de SM, de dyslipidémies et de préhypertension ou d'hypertension [4].

Plusieurs autres équipes de chercheurs sont arrivées à des conclusions similaires, quant à l'altération de la santé cardiométabolique à long terme des survivants de cancer pédiatrique. Une étude rétrospective a également constaté que les survivants sont presque 2 fois plus à risque d'avoir recours à des médicaments pour le contrôle de la pression artérielle, des lipides sanguins et du diabète que leurs frères et sœurs [135]. Il a été démontré qu'à long terme, les survivants de la LLA de l'enfant (âge médian: 25 ans, temps médian post-traitement: 18 ans) ont un profil métabolique défavorable et présentent des caractéristiques du SM [136]. Ces facteurs de risque comprennent le surpoids et l'obésité [110, 134, 137], se manifestant par un IMC, un tour de taille, un pourcentage de gras corporel supérieur et une masse maigre inférieure aux individus n'ayant pas eu de cancer à l'enfance [138-140]. Les survivants de cancer pédiatrique présentent des altérations au niveau des lipides sanguins (hypertriglycémie, hypercholestérolémie et niveau de HDL-c faible, non-HDL cholestérol sérique à jeun) [137-142], des désordres du métabolisme du glucose (perte de sensibilité à l'insuline, élévation de la glycémie à jeun et de l'insulinémie à jeun, faible taux sérique de somatomédine C ou Insulin-like Growth Factor One (IGF-1) ou DBT2) [137-140, 142-144] et/ou de présenter de la préhypertension ou de l'hypertension artérielle [137]. Puis, dans un groupe de 38 survivants en rémission depuis en moyenne 8 ans, il a été noté que 21% d'entre eux étaient résistants à l'insuline (HOMA-IR >2.5 pour les enfants et >4.0 pour les adolescents) [145].

2.3.4 Autres complications à long terme

En plus des complications cardiométaboliques qui peuvent survenir au cours de la vie des individus ayant survécu à la LLA pédiatrique, ceux-ci sont plus à risque de développer un néoplasme secondaire, impactant considérablement la survie [146-149]. Une étude multicentrique menée en 2013 ayant analysé la prévalence de tumeur maligne secondaire d'un échantillon de plus de 54 000 patients dont le diagnostic de la LLA et son traitement avaient eu lieu entre 1980 et 2007. Ces travaux ont démontré que 642 individus, ce qui équivaut à 1.2% de l'échantillon initial, ont développé un deuxième cancer et que 54% étaient des cancers de type hématologiques (LMA, syndrome myélodysplasique), 22% souffraient de tumeurs du SNC et 12%

étaient des carcinomes [150]. Cependant, le risque de développer des tumeurs malignes comparativement à la population générale n'a pas été étudié dans cette cohorte. Une étude menée sur 13 581 individus (âge médian: 23 ans, temps médian post-diagnostic: 15.4 ans) a observé que les survivants de cancer pédiatrique ont 6 fois plus de risque de développer un cancer, tous types confondus, que la population générale [151]. Le cancer du sein (16 fois), le cancer des os (19 fois) et le cancer de la thyroïde (11 fois) constituaient les 3 catégories avec le risque le plus élevé en comparaison avec la population générale [151].

De plus, les atteintes osseuses sont fréquemment constatées chez les survivants de LLA de l'enfant, notamment une densité osseuse réduite [152-154], de l'ostéopénie et de l'ostéoporose [154, 155], un risque accru de fractures [154] et de nécrose avasculaire [156].

2.3.5 Effet du sexe

Une revue de littérature publiée en 2007 s'est intéressée aux différences sexuelles en lien avec les problèmes de santé observés à long terme chez les survivants de cancer pédiatrique. Celle-ci démontre que, bien que l'incidence de cancer à l'enfance soit plus élevée chez les garçons, ce sont les femmes qui sont plus susceptibles d'être aux prises avec des effets indésirables à l'âge adulte [157]. En effet, plusieurs études ont montré que les femmes survivantes sont plus nombreuses à développer des troubles neurocognitifs (difficultés à exécuter efficacement des tâches [158], difficultés académiques [159] et troubles de mémoire [160]) et des problèmes cardiovasculaires (insuffisance cardiaque congestive et dysfonction valvulaire [133], diminution de la masse du ventricule gauche [140, 142], et taux sérique moyen de Nt-proBNP [142]), lorsque comparées aux survivants masculins, mais aussi à la fratrie ou à des contrôles appariés pour l'âge. D'ailleurs, il a été démontré qu'elles sont aussi particulièrement sensibles aux impacts cardiotoxiques de certains agents chimiothérapeutiques, notamment les anthracyclines et la doxorubicine [157]. Les effets dommageables sur la santé métabolique de la RTC, particulièrement des femmes, ont été démontrés à maintes reprises dans la littérature. Effectivement, *Gurney et al.* ont observé que, lorsque comparées à des survivantes n'ayant pas

été irradiées, les survivantes ayant reçu de la RTC à l'enfance avaient un tour de taille moyen de 10 cm plus élevé, un IMC moyen accru et des taux à jeun de HDL-C sanguin inférieur [15]. Une autre étude a montré que les survivantes de la LLA pédiatrique ayant été traitées avec de la RTC, présentaient un IMC plus important que des femmes ayant seulement reçu la chimiothérapie [161]. Dans cette étude, la relation entre la RTC et le gain de poids était intimement liée au sexe féminin [161]. Les femmes survivantes sont également plus à risque de néoplasmes secondaires [149, 162], de SM [15], d'obésité sarcopénique [163], d'ostéonécrose et d'hypothyroïdie [157] que les survivants hommes. Il a été observé qu'elles ont des taux sériques à jeun moyens supérieurs d'insuline, de non-HDL cholestérol, de protéine C-réactive (CRP) aux survivants masculins [142] et des niveaux sériques à jeun de leptine plus élevés que des femmes contrôles [140]. Dans le cadre de l'étude PETALE, *Morel et al.* ont rapporté dans un article publié en 2017 que 75% des femmes survivantes souffraient de dyslipidémie versus 60% des hommes [141]. Les mécanismes contribuant à la prédisposition des femmes à ces complications demeurent méconnus. Néanmoins, le dimorphisme sexuel, influençant la composition corporelle (proportion plus élevée de gras chez la femme) et l'expression de certains gènes (récepteur de la leptine et transporteur MDR1 dans le foie) sont des hypothèses émises dans la littérature [157].

Nous constatons donc la forte prévalence de complications cardiométaboliques au diagnostic et pendant les traitements qui se maintiennent après la fin des traitements, que ce soit à court terme ou à long terme. Les impacts néfastes de la maladie et des traitements sur la santé métabolique justifient l'importance d'adresser cette problématique. En effet, une meilleure compréhension des mécanismes influençant la progression de complications cardiométaboliques est primordiale pour améliorer leur santé globale, offrir des pistes de réflexion relatives aux stratégies de traitement et à la prévention des maladies chroniques.

2.3.6 Mécanismes proposés

La section suivante relate les principaux facteurs pouvant contribuer au développement des complications cardiométaboliques chez les survivants de cancer pédiatrique et les mécanismes

sous-jacents associés à ces complications. Le SO et l'inflammation, le microbiote intestinal et les habitudes alimentaires y seront abordés.

2.3.6.1 Le SO et l'inflammation

Les espèces réactives oxygénées (ERO) sont principalement produites par la respiration cellulaire mitochondriale, par des enzymes (NADPH oxydase (NOX), xanthine oxydase, oxyde nitrique synthase (NOS), peroxyosomes) ou par des facteurs environnementaux, par exemple, le tabac et les radiations ionisantes [164]. Les ERO ont des rôles physiologiques fondamentaux et sont impliqués dans plusieurs voies de signalisation, dans la régulation du cycle cellulaire et dans la défense contre les pathogènes [164]. L'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (OH^-) et l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2^-$) en sont des exemples. La production de ERO est contrôlée par des enzymes (par exemple la catalase (CAT), la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase) et des vitamines (les caroténoïdes, C, E) antioxydantes. Lorsque l'équilibre entre la production de ERO et les défenses antioxydantes est brisé, il y a alors présence de SO menant à des dommages des structures cellulaires, comme les lipides et des protéines et l'ADN [164]. Ce SO déclenche une réponse inflammatoire accrue, impliquées dans le développement des maladies métaboliques chroniques [165-167].

2.3.6.1.1 Lien entre le SO, l'inflammation et les complications cardiométaboliques

Le SO et l'inflammation jouent un rôle majeur dans le développement de l'athérosclérose. Le SO et l'inflammation systémique peuvent mener à une dysfonction vasculaire, contribuant au développement de l'athérosclérose et à la progression des MCV [168]. La dysfonction endothéliale occasionne une diminution de la biodisponibilité de l'oxyde nitrique (ON), un puissant vasodilatateur et anticoagulant, en plus d'une augmentation des molécules vasoconstrictrices, comme l'endothéline-1, l'angiotensine II, et la norépinéphrine [169, 170]. Parmi les facteurs contributifs à la dysfonction endothéliale, on retrouve l'hypertension, l'hypercholestérolémie et le diabète [169]. En effet, l'hyperglycémie entraîne des dommages vasculaires [169, 171] via l'augmentation des *advanced glycation end products* (AGE), qui sont

des protéines ou des lipides ayant subi une glycation [172]. Les produits s'accumulent dans la matrice extracellulaire des vaisseaux sanguins et créent des altérations. De plus, les AGE activent leurs récepteurs (RAGE), stimulant différentes voies de signalisations (*transforming growth factor* (TGF- β), NF- κ B, *mitogen-activated protein kinase* (MAPK, ERK1/2MAPK, p38MAPK) et NOX), favorisant la production de molécules d'adhésion (VCAM-1, sélectine E), de facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et de cytokines pro-inflammatoires (interleukine-1 β (IL-1 β), interleukine-6 (IL-6), facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α)) [171]. L'hyperglycémie contribue également à la dysfonction endothéliale en régulant les voies de la protéine kinase C sensible à l'oxydoréduction, du polyol et de l'hexosamine induisant du SO [171]. Plusieurs autres éléments contribuant à la progression de l'athérosclérose ont été soulevés dans la littérature, notamment les mauvaises habitudes alimentaires, le tabac, la sédentarité et un niveau de cholestérol circulant élevé, spécifiquement le LDL, reconnu pour être une lipoprotéine athérogène [173, 174]. Dans le même ordre d'idées, il a été démontré que la présence de particules de LDL de petites tailles est associée au risque de MCV [175, 176]. En effet, contrairement aux LDL de plus grande taille, les particules de LDL petites et denses ont une affinité réduite avec les récepteurs tissulaires de LDL et de ce fait restent dans la circulation sanguine plus longtemps en plus d'être plus sensibles à l'oxydation [177, 178]. De plus, les petites particules de LDL pénètrent plus facilement dans la paroi endothéliale des vaisseaux où elles subissent des transformations, dont l'oxydation par les ERO. Cette oxydation provoque une réponse inflammatoire par les cellules endothéliales, exprimant des cytokines pro-inflammatoires et des molécules d'adhésion, facilitant la capture des monocytes en circulation au site de la lésion [179]. Les monocytes se différencient en macrophage dans l'espace sous-endothélial et assimilent les LDL oxydés, reconnus par les récepteurs Toll-like (RTL) à la surface des macrophages. Les macrophages gorgés de LDL oxydé deviennent alors des cellules spumeuses qui libèrent à leur tour des cytokines pro-inflammatoires, favorisant le recrutement de d'autres monocytes [169, 170, 179, 180]. Cette accumulation de cellules immunitaires et de lipides oxydés favorisent la migration et l'accumulation de cellules musculaires lisses, contribuant à la production de collagène, de fibronectine et d'élastine et participant à la formation de la chape fibreuse visant à recouvrir les dépôts et protéger le sang [179, 181]. La plaque athéromateuse rétrécit l'artère et peut dans certains cas se détacher et provoquer un

blocage du flux sanguin, causant les maladies cardiaques. Donc, le SO et l'inflammation sont des éléments importants dans la cardiopathogénèse, provoquant des dommages cellulaires et vasculaires et en favorisant la formation de la plaque d'athérome.

Le SO et l'inflammation chronique de bas grade sont des mécanismes importants dans le développement de maladies chroniques reliées à l'obésité. Brièvement, l'obésité se définit par une accumulation excessive de gras et par une hypertrophie des adipocytes. L'hypertrophie adipocytaire provoque une dysfonction du tissu adipeux et déclenche l'infiltration des macrophages afin de procéder à la phagocytose des cellules dysfonctionnelles [182]. Aussi, les adipocytes inflammés libèrent localement et dans la circulation systémique une grande quantité de cytokines et adipokines pro-inflammatoires, notamment le TNF- α , l'IL-6, l'IL-1 β , l'interleukine 8 (IL-8), le chemokine ligand 2 (MCP-1), la leptine, la résistine, le granzyme B, le retinol binding protein 4 (RBP4), le LPS-binding protein (LBP), la fétuine A et stimulent la production hépatique de la CRP, du fibrinogène et de l'amyloïde A sérique (SAA), qui sont des biomarqueurs de l'inflammation systémique [182-185]. De plus, le tissu adipeux inflammé produit moins d'adiponectine, une adipokine jouant un rôle anti-inflammatoire et protecteur d'un point de vue métabolique par son action dans l'amélioration de la sensibilité à l'insuline et de protection de l'oxydation des lipides [183, 184]. L'inflammation de bas grade causée par la dysfonction du tissu adipeux observée dans l'obésité est associée à divers problèmes de santé, tels que la RI, le DBT2, le SM et l'athérosclérose [18, 171, 182-184].

2.3.6.1.2 Lien entre le SO, l'inflammation et le cancer

Une augmentation du SO lors de la progression cancéreuse pourrait contribuer à expliquer le potentiel lien entre la maladie et le développement de complications cardiométaboliques. Des chercheurs ont montré, dans un groupe de 9 enfants atteints de la LLA et comparativement à des enfants sans maladie, des niveaux d'enzymes antioxydantes diminués et davantage de dommages oxydatifs de l'ADN [186]. Dans une autre étude, les enfants diagnostiqués avec la LLA présentaient des niveaux plasmatiques supérieurs de substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS),

un marqueur de SO et une capacité antioxydante totale inférieure comparativement à des contrôles en santé, appariés pour l'âge [17]. Dans le même ordre d'idées, une étude menée auprès de 80 patients atteints de la LLA pédiatrique a constaté qu'au diagnostic, les participants avaient des niveaux sériques plus élevés de protéines carbonylées, un marqueur de l'oxydation protéique et de TBARS plasmatique [13]. Ils ont également démontré que les participants leucémiques avaient une activité antioxydante inférieure, évaluée par le dosage des enzymes antioxydantes, la CAT et la SOD) dans le sang total, et d'antioxydants non enzymatiques, soit le thiol non protéique plasmatique et la vitamine E sérique, par rapport aux sujets contrôles en santé [13]. Cette double action, qui consiste en une augmentation du SO dans l'organisme et une moins grande défense antioxydante, accentue la problématique et limite la capacité du corps à contrôler les effets néfastes encourus par un important SO.

De plus, la prolifération des cellules cancéreuses déclenche une réponse inflammatoire qui se traduit par une activation de la défense immunitaire et une libération de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines et de protéines de phase aiguë (CRP et l'haptoglobine) [187, 188] afin de combattre cette menace. En effet, il a été démontré que, comparativement à des participants en santé, les patients atteints de la LLA pédiatrique ont, au diagnostic, des niveaux bas d'adiponectine, une adipokine ayant des fonctions généralement considérées anti-inflammatoires [189] et des niveaux élevés de leptine et de résistine [12], des adipokines pro-inflammatoires [189].

En somme, puisque la relation entre le SO, l'inflammation et le développement de certaines maladies chroniques notamment l'obésité, la RI, le diabète, la dyslipidémie, l'athérosclérose et les MCV est bien connue [18, 190-192], il est tout à fait probable que le cancer même favorise un environnement propice à l'installation de ces complications de santé, par la stimulation des processus pro-oxydants et pro-inflammatoires.

2.3.6.1.3 Le SO et l'inflammation pendant les traitements antinéoplasiques

Une augmentation du SO a été observée durant les traitements et chez les survivants de cancer de l'enfant. Une étude incluant 23 enfants atteints de la LLA a démontré un SO supérieur, défini par des niveaux de capacité antioxydante totale faible et de TBARS élevés dans le plasma, à la fin des phases d'induction (phase I : 4 semaines et phase II : 8 semaines) et de consolidation (16 semaines) comparativement au niveau de SO mesuré au diagnostic [17]. *Battisti et al.* ont aussi évalué le SO et la capacité antioxydante chez les enfants atteints de LLA pendant les différentes phases des traitements et les ont comparés à des enfants contrôles en santé [13]. Ils ont observé une plus grande oxydation protéique, mesurée par la moyenne de protéines carbonylées dans le sérum (vs contrôles) et lipidique, évaluée par le niveau moyen de TBARS plasmatique, pendant toutes les phases de traitements et après la fin des traitements en comparaison aux niveaux mesurés chez des contrôles sains. De plus, ces chercheurs ont observé des niveaux inférieurs d'enzymes antioxydantes (CAT et SOD), du thiol non protéique et de la vitamine E sérique après la phase d'induction par rapport au groupe contrôle [13]. Le lien entre l'exposition à des rayons ionisants et le SO a été décrit à plusieurs reprises dans la littérature. En effet, la radiothérapie cause des lésions à l'ADN des cellules et génère des ERO, responsables de l'oxydation protéique et lipidique. Ces modifications mènent ultimement à la mort des cellules cancéreuses, mais peuvent également endommager les cellules saines et causer des altérations chromosomiques, augmentant le risque de cancers secondaires [162, 193]. Ces lésions déclenchent une réponse de stress, notamment par la génération de radicaux libres et l'activation des signaux menant une production accrue de cytokines, de chimiokines et de facteurs de croissance. Ces modifications provoquent une inflammation chronique de bas grade [194] et un vieillissement cellulaire [195]. La chimiothérapie a été reliée à une augmentation de l'inflammation. Effectivement, la doxorubicine a été associée à une augmentation des niveaux plasmatiques de TNF- α [196]. Puis, les individus exposés à l'anthracycline avaient des niveaux plasmatiques d'IL-8 supérieurs à un groupe contrôle en santé [197].

2.3.6.1.4 Lien entre la radiothérapie et les complications cardiométaboliques et hormonales

Il a été démontré que la radiothérapie augmente le risque de cardiomyopathies, telles que l'insuffisance cardiaque congestive, les valvulopathies et la fibrose myocardique, le risque de développer de problèmes d'arythmies, le risque d'inflammation des structures cardiaques, notamment la péricardite ainsi que le risque de coronaropathies pouvant entraîner des infarctus du myocarde [133, 142, 198].

Des études ont également noté une association positive entre l'exposition à la RTC et l'obésité [134, 161] et les taux sériques à jeun de LDL-c [4]. De plus, *Oeffinger et al.* ont montré que, comparativement aux survivants de la LLA pédiatrique ayant été traités uniquement avec de la chimiothérapie, ceux ayant été exposés à la RTC présentent des niveaux plasmatiques à jeun de TG plus élevés et d'IGF-1 inférieurs, une hormone sécrétée en réponse à une stimulation par la GH favorisant la croissance osseuse et musculaire [134]. *Gurney et al.*, quant à eux, ont conclu que l'exposition à la RTC était associée à des taux plasmatiques à jeun de LDL-c, d'insuline et un indice HOMA-IR plus élevés, ainsi que des niveaux d'IGF-1 inférieurs [15].

Les rayons ionisants peuvent aussi perturber le système endocrinien. Plus spécifiquement, la RTC, dont les rayons se concentrent dans la région où se trouve l'hypothalamus, organe essentiel à la régulation hormonale, a été associée à une diminution de la sécrétion hypothalamique de l'hormone de croissance [15, 16, 144, 199-201], à de l'hypogonadisme et de l'hypothyroïdie [200-202] et plus rarement à une déficience en hormone adrénocorticotrope (ACTH) [90, 200], jouant un rôle dans la sécrétion du cortisol par les glandes surrénales. Les études suggèrent que l'impact de cette thérapie sur le système endocrinien est plus important lorsque la dose (≥ 30 Gy) et le temps écoulé depuis l'exposition (entre 8 et 32 ans) augmente [203]. Par ailleurs, une étude menée auprès de 44 survivants adultes de la LLA a montré que, 17 ans après la fin des traitements, l'ensemble des patients étaient déficients ou insuffisants en hormone de croissance [140]. Ce manque de production d'hormone de croissance a été associé négativement avec plusieurs

facteurs de risque de MCV, notamment des valeurs élevées à l'égard du pourcentage de masse adipeuse, de l'IMC, du ratio hanche-taille, du tour de taille, du taux d'insuline, de leptine, de LDL-c de l'indice HOMA-IR (Homeostatic Model Assessment for Insulin resistance) et des niveaux faibles de HDL-c ainsi qu'une fonction cardiaque diminuée [15, 17, 140]. Bien que la relation entre l'hypothyroïdisme et la dyslipidémie soit bien établie dans la population générale [204], ce lien n'a pas été étudié chez les individus atteints ou survivants de la LLA pédiatrique.

2.3.6.1.5 Lien entre la chimiothérapie et les complications cardiométaboliques

Parmi les médicaments utilisés pendant la chimiothérapie affectant la santé à long terme, la doxorubicine a un impact sur la dyslipidémie et les problèmes cardiaques. Une étude menée par notre laboratoire a démontré que l'exposition à des doses de doxorubicine ≥ 90 mg/m², correspondant à la dose médiane de la cohorte de 50 patients (âge moyen : 11.3 ans, temps moyen depuis le diagnostic : 3.07 ans), était associée à des niveaux de HDL-c bas chez les jeunes survivants de cancer pédiatrique [205]. Il a également été montré qu'il existe une relation dose-dépendante entre la doxorubicine et l'insuffisance cardiaque congestive [206].

Les corticostéroïdes entraînent aussi des conséquences sur la santé métabolique des patients. Une étude prospective a observé qu'après 4 jours consécutifs d'administration de dexaméthasone (6 mg/m²/jour) pendant la phase de maintenance des traitements de la LLA pédiatrique, la prévalence de l'hypertension (+14%), de l'hyperglycémie (+4.8%), de l'hypertriglycéridémie (+16.7 %) et des niveaux de cholestérol total sanguin élevés (+16.7%) et d'insuline élevée (+80%) ainsi que la prévalence de RI (HOMA-IR>3.4) (+77%) étaient augmentées comparativement aux paramètres métaboliques mesurés le jour avant le début de la prise de corticostéroïdes [8]. L'utilisation de l'asparaginase et des corticostéroïdes peut causer de l'hyperglycémie pendant les traitements, étant deux molécules ayant un impact sur la voie métabolique de l'insuline [9]. D'un côté, l'asparaginase inhibe la sécrétion d'insuline et l'expression des récepteurs de l'insuline [199] et d'un autre côté, les corticostéroïdes stimulent la néoglucogenèse hépatique et augmentent le risque de développer de la résistance à l'insuline

[207]. Dans une étude publiée en 2019, les survivants de la LLA pédiatrique avaient 1.58 fois plus de risque de développer un DBT2 plus la dose cumulative de dexaméthasone augmentait (par tranche de 1000 mg/m²) [143]. Aussi, dans une cohorte de 257 enfants, 7% d'entre eux ont développé de l'hypertriglycéridémie sévère au cours des traitements de la LLA et la grande majorité de ces événements (93%) ont eu lieu dans les 2 semaines suivant l'administration conjointe d'asparaginase et de dexaméthasone [208]. Dans cette étude, des doses cumulatives plus importantes d'asparaginase et de dexaméthasone ont été identifiées comme un facteur de risque important de l'hypertriglycéridémie [208]. De plus, d'autres complications ont été associées à l'administration de l'asparaginase, telles que la pancréatite, les thromboses, l'encéphalopathie et plus rarement, la toxicité hépatique [9].

Les anthracyclines, réputées pour leurs effets cardiotoxiques, sont reliées à une fraction d'éjection du ventricule gauche diminuée [140] et l'insuffisance cardiaque congestive [133]. Les survivants de cancer diagnostiqué avant 21 ans et ayant été exposés à des doses de ≥ 250 mg/m² d'anthracyclines ont un risque accru de maladie du péricarde et dysfonction valvulaire [133]. De plus, *Armstrong et al.*, dans une étude d'envergure, se sont intéressés aux causes de mortalité des survivants de cancer pédiatrique et aux facteurs de risque associés dans une cohorte de 20 483 individus [162]. Avoir été exposé à des doses d'anthracyclines supérieures ou égales à 250 mg/m² était associé à un risque accru de mortalité liée à une complication cardiaque et l'exposition aux agents alkylants est associée à un risque relatif plus élevé de succomber à un néoplasme secondaire [162].

Finalement, une exposition aux cyclophosphamides, peu importe la dose administrée, a été reliée à un risque plus élevé de développer des maladies péricardiques chez les survivants de cancer pédiatrique [133].

À la lumière de ces données, il est clair que les traitements causent des altérations cardiométaboliques et hormonales sérieuses, par des processus pro-oxydant et pro-inflammatoire, survenant à un moment crucial du développement de l'individu et contribuant au développement de comorbidités sévères à l'âge adulte chez les survivants de cancer pédiatrique.

2.3.6.1.6 Le SO et l'inflammation chez les survivants de cancer pédiatrique

Actuellement, aucune étude ne s'est penchée sur la mesure du SO chez les survivants de cancer pédiatrique. Toutefois, les niveaux de plusieurs marqueurs d'inflammation chronique ont été trouvés supérieurs lorsque comparés à des contrôles. Cette inflammation est observable aussi peu qu'un mois post-traitement [209], quelques années après la fin des traitements [210] et près de 20 ans après la fin de ceux-ci [136, 139]. Plusieurs études ont observé des taux élevés de CRP (2.2 x plus élevé) [210], de cytokines pro-inflammatoires, notamment l'interleukine 2 (IL-2) (3x plus élevé) [209], l'IL-6 (1.1 x plus élevé) [210], l'IL-8 (1.25 x plus élevé) [202], et le TNF- α (2x plus élevé) [209]. Il a également été établi dans une étude parue en 2017 que les survivants de la LLA pédiatrique, lorsque comparé à un groupe contrôle pairés selon l'âge et le sexe, présentent une longueur télomérique des leucocytes inférieurs, un indicateur de vieillissement cellulaire accéléré [136]. Une diminution de la longueur des télomères a par ailleurs été associée à l'inflammation chronique observée dans plusieurs maladies chroniques [211].

2.3.6.1.7 Lien entre l'inflammation et les complications cardiométaboliques chez les survivants de cancer pédiatrique

Cette inflammation chronique marquée a été associée positivement à plusieurs facteurs de risques cardiométaboliques dont l'IMC, le tour de taille, le niveau sérique d'insuline, le taux d'hémoglobine glyquée (HbA1c), la pression diastolique élevée et aux marqueurs de plaque athéromateuse [136, 202, 210]. Dans le même ordre d'idées, une étude récente menée dans notre laboratoire visant à identifier des biomarqueurs liés aux complications cardiométaboliques chez les survivants de la LLA pédiatrique a démontré que plusieurs marqueurs d'activité

inflammatoire accrue (ratio élevé leptine/adiponectine, PAI-1, TNF- α et CRP élevés) étaient reliés à l'obésité, la RI, la dyslipidémie et au SM [19].

Donc, il est évident que le SO et l'inflammation sont des mécanismes, interreliés se stimulant mutuellement, à considérer dans le développement des complications cardiométaboliques chez les survivants de la LLA pédiatrique.

2.3.6.2 La modulation du microbiote intestinal et de ses métabolites dérivés

Le microbiote intestinal est, depuis quelques années, considéré par la communauté scientifique comme un facteur pouvant influencer le développement des maladies chroniques. Cette section établit ce qu'est la dysbiose intestinale, le lien entre la dysbiose intestinale et les AGCC et le développement des complications cardiométaboliques. De plus, la dysbiose intestinale pendant les traitements antinéoplasiques ainsi que chez les survivants de cancer pédiatrique sera abordés.

2.3.6.2.1 La dysbiose intestinale et endotoxémie métabolique

La dysbiose intestinale se définit par une perturbation de l'homéostasie du microbiome, affectant la composition et la diversité microbienne, la production des AGCC, l'intégrité de la paroi intestinale et facilitant la translocation des molécules pro-inflammatoires, provoquant une réponse inflammatoire inhabituelle [212, 213].

L' α -diversité est un indicateur de la richesse bactérienne et se réfère au nombre d'espèces microbienne différente dans un échantillon donné [214]. La β -diversité, quant à elle, compare la richesse microbienne entre deux communautés, groupes ou échantillons [214]. Une diminution de la diversité microbienne est associée à un risque plus élevé de développer des complications cardiométaboliques [215].

La production d'AGCC peut également être affecté par des changements dans la composition et la diversité microbienne. Le microbiote intestinal est majoritairement composé de deux phylums distincts, les *Firmicutes* (Gram-positive) et les *Bacteroidetes* (Gram-négative) [216], dont plusieurs genres sont responsables pour la synthèse d'AGCC. Les genres *Akkermansia*, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium*, *Eubacterium*, *Prevotella*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Roseburia*, *Salmonella*, *Coprococcus* en sont des exemples [217, 218]. Les AGCC sont des molécules dérivées de la fermentation des fibres non digestibles dans le côlon. Les AGCC prédominants sont l'acétate, le propionate et le butyrate. Environ 5% des AGCC produits sont excrétés dans les selles. Localement, les AGCC servent de substrat énergétique pour les colonocytes, participent au maintien de l'intégrité de la barrière intestinale en favorisant l'expression des protéines des jonctions serrées et des mucines tapissant la paroi intestinale et stimule la croissance et la diversité microbienne [23, 213, 219-222].

Les jonctions serrées, constituées de protéines transmembranaires (occludines, claudines), de molécules d'adhésion jonctionnelle (JAM) et de protéines adaptatrices (ZO), ont une responsabilité primordiale dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale. Elles contrôlent le passage de certaines molécules et jouent un rôle de protection en empêchant la diffusion de pathogènes et d'endotoxines entre deux cellules épithéliales [20, 223]. Il a été démontré que l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires en réponse à la dysbiose intestinale inhibe la synthèse protéique de Zonula occludens-1 (ZO-1) [178]. Cette diminution perturbe l'homéostasie des jonctions serrées et entraîne une fragilisation de la barrière intestinale [224]. Une perméabilité accrue au niveau des jonctions serrées favorise le passage de molécules indésirables vers la circulation systémique, associées à divers désordres métaboliques [20].

En effet, la fragilisation de la barrière intestinale permet le passage de LPS, communément appelé endotoxine, située sur la membrane externe des bactéries à Gram négative (par exemple les *Bacteroidetes*). La présence de LPS dans la circulation systémique active les RTL à la surface des

cellules immunitaires et stimule l'activation des voies de signalisation pro-inflammatoire, notamment le NF- κ B et le facteur de régulation de l'interféron (IRF) menant à une expression accrue de cytokines pro-inflammatoires (IL-8, IL6, TNF- α , IL-1 β , interféron bêta (IFN- β)) [20, 23, 225] et une augmentation des ERO induit par une augmentation de l'expression NOX2 démontrée dans une étude cellulaire [226].

Ce phénomène se nomme endotoxémie métabolique et a été associé à la RI, à l'obésité, à la stéatose hépatique, aux MCV et au SM [20, 23, 213, 220, 221, 225, 227]. Dans la population générale, un niveau élevé d'endotoxines dans le sang est positivement corrélé au ratio taille-hanche, un taux sérique de CT, de TG et d'insuline à jeun et corrélé négativement au HDL-c sérique [228].

2.3.6.2.2 Lien entre la dysbiose intestinale et les complications métaboliques

Des changements dans la composition et la diversité du microbiote intestinal ont été observés dans plusieurs maladies chroniques, telles que l'obésité et le DBT2. L'obésité a été reliée à des différences dans la diversité (α et β -diversité) et la composition (proportion des différents phyla, classes, ordres, familles, genres et espèces de microorganismes) bactérienne en comparaison à la population générale, notamment par un ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* plus élevé en partie dû à une abondance de *Bacteroidetes* inférieure [21]. Des analyses supplémentaires ont révélé que les espèces *Blautia hydrogenotrophica*, *Coprococcus catus*, *Eubacterium ventriosum*, *Ruminococcus bromii*, *Ruminococcus obeum* appartenant du phylum des *Firmicutes*, étaient plus prédominantes dans le groupe de sujets obèses [21]. Ces différences microbiennes sont aussi observables chez les enfants obèses. En effet, une étude comparant une cohorte d'enfants obèses à des enfants ayant un poids santé a noté un ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* supérieur et une abondance plus élevée des bactéries du genre *Lactobacillus* chez les enfants obèses [229]. D'ailleurs, une association positive entre la présence de *Lactobacillus* dans ce groupe de sujets obèses avec la CRP plasmatique, marqueur inflammatoire, a été établie [229].

Des changements au niveau du microbiote intestinal ont également été observés chez les individus ayant le DBT2 [22, 227]. Effectivement, une étude a comparé la composition du microbiote intestinal de 345 sujets ayant le DBT2 à des contrôles sans diabète et ont démontré que les individus diabétiques présentaient une dysbiose intestinale, se manifestant par une moins grande abondance des bactéries bénéfiques pour l'organisme (*Clostridiales* sp. SS3/4, *Eubacterium rectale*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia intestinalis*, *Roseburia inulinivorans*) et une plus grande abondance des bactéries opportunistes (*Bacteroides caccae*, *Clostridium hathewayi*, *Clostridium ramosum*, *Clostridium symbiosum*, *Eggerthella lenta*, *Escherichia coli*) [22]. Plus spécifiquement, une revue de littérature s'est intéressée au rôle du microbiote intestinal dans la physiopathologie du DBT2. À la suite de l'analyse de 42 études humaines, les auteurs ont conclu que, malgré une grande variabilité des résultats obtenus, plusieurs études ont démontré des résultats similaires, notamment que les bactéries appartenant aux genres *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Akkermansia* et *Roseburia* corrèlent négativement avec la présence de la maladie tandis que les genres *Ruminococcus*, *Fusobacterium* et *Blautia* corrèlent positivement [230]. Dans le même ordre d'idées, *Larsen et al.* ont mis en évidence une abondance inférieure du phylum *Firmicutes* chez les hommes diabétiques comparativement à des hommes non-diabétiques. L'étude a également démontré que le ratio des phyla *Bacteroidetes/Firmicutes* était associé positivement avec le glucose plasmatique [231]. Tous ces éléments suggèrent un lien entre la dysbiose intestinale, l'obésité et le DBT2.

2.3.6.2.3 Lien entre les AGCC et les complications métaboliques

Une production diminuée d'AGCC fragilise la barrière intestinale et induit une inflammation systémique chronique, observable en contexte de RI et de DBT2 [220, 227]. Le butyrate joue un rôle anti-inflammatoire en régulant l'expression de cytokines pro-inflammatoires en inhibant la voie NF- κ B et en activant les lymphocytes T régulateurs (Treg) [23, 219-222, 232] et en diminuant l'activité des histones désacétylases (HDAC) et des macrophages [23]. Le propionate diminue le SO en stimulant l'expression des enzymes antioxydantes dans le côlon [219]. Ensuite, les AGCC

non métabolisés par les colonocytes migrent dans la circulation systémique où ils agissent sur plusieurs organes. Dans le foie et le muscle, les AGCC sont utilisés comme source d'énergie et sont aussi impliqués dans la lipogenèse et la néoglucogenèse [23, 219, 221]. Leurs actions permettent d'améliorer l'homéostasie lipidique et glucidique et de stimuler le métabolisme énergétique par l'activation d'AMPK dans le foie [23, 221]. Effectivement, les AGCC activent les récepteurs couplés aux protéines G 41 et 43 dans l'intestin, menant à la sécrétion intestinale de peptide YY (PYY) et le glucagon-like peptide-1 (GLP-1), des incrétines qui régulent la prise alimentaire, stimulent la libération d'insuline par les cellules β du pancréas, et améliorent la sensibilité à l'insuline [23, 213, 220, 226]. De plus, la stimulation du récepteur couplé aux protéines G 43 par les AGCC favorise la lipogenèse du tissu adipeux, ce qui permet de diminuer les acides gras libres en circulation et leur déposition dans le foie et les muscles [23]. Donc, les AGCC auraient un rôle de protection contre le développement de complications métaboliques, soit l'obésité, la RI, le DBT2 [23].

2.3.6.2.4 La dysbiose intestinale pendant les traitements et chez les survivants de cancer pédiatrique

Une attention grandissante est portée à mieux comprendre la contribution de la dysbiose intestinale sur les complications cardiométaboliques dans la population d'enfants atteints de cancer et chez les survivants de cancer pédiatrique. Une revue de littérature publiée en 2021 étaye bien la problématique et appuie que les enfants atteints de LLA ont une composition microbienne différente que des contrôles et que cette composition change tout au long des traitements et demeure différente à long terme, même après la fin des traitements [233].

La chimiothérapie est un élément contribuant aux perturbations de l'homéostasie du microbiote intestinal. Certains agents créent des dommages à la muqueuse du tractus gastro-intestinal, affectent la perméabilité intestinale et bouleversent l'équilibre microbien, ce qui facilite l'entrée de molécules pro-inflammatoires dans la circulation systémique [212]. Les antibiotiques donnés en prophylaxie pendant les traitements chimiothérapeutiques [234], certains agents

chimiothérapeutiques spécifiques, comme la daunorubicine, l'étoposide et la cytarabine [234], la radiothérapie axée sur la région abdominale [235] et la GCSH [236] ont été identifiés dans la littérature comme facteur influençant la modulation du microbiote intestinal chez les individus atteints de cancer. Le MTX est également connu pour ses effets secondaires gastro-intestinaux, par exemple les vomissements, les diarrhées et les mucosites qui sont fréquemment observées durant les traitements de la LLA [237, 238]. Le MTX endommage la paroi intestinale en diminuant la longueur des microvillosités et favorisant l'infiltration de cellules inflammatoire [239]. Cet agent a également été associé à une diminution de l'abondance bactérienne, à des changements dans la composition bactérienne [240] et à une augmentation de la perméabilité intestinale en réduisant l'expression protéique des jonctions serrées [241]. Une étude menée chez des enfants atteints de la LLA a démontré une diminution des familles de bactéries *Bifidobacteria*, *Lactobacillus* et *Escherichia coli* dans des échantillons fécaux après 3 jours de traitement avec du méthotrexate à haute dose [242]. La relation inverse entre le microbiote et les traitements est aussi observée. En effet, le microbiote est considéré comme un facteur influençant la réponse aux traitements antinéoplasiques [243]. Une altération du microbiote intestinal entraîne une augmentation de la toxicité de la médication et des effets secondaires [244-246]. De plus, une association entre la dysbiose intestinale et les issues cliniques défavorables après une GSCH a été démontrée [247].

Des études cliniques ont été menées afin d'évaluer la dysbiose intestinale chez les enfants avec la LLA à différents moments de leur parcours, soit au diagnostic, pendant les traitements et après les traitements. Certains ont évalué les changements du microbiote intestinal chez les enfants atteints de la LLA, du diagnostic à la rémission. Au diagnostic, les enfants atteints de la LLA ont une α -diversité inférieure à celle de leur fratrie [115] et aux participants contrôles [248-250]. Une étude a également soulevé des différences entre les patients avec la LLA et les contrôles pour la β -diversité et l'abondance relative bactérienne au diagnostic [249, 251]. Pendant les traitements, une réduction de la diversité microbienne est constatée par rapport au diagnostic [115, 245, 250] et en comparaison à des sujets sains [251]. Une modulation de l'abondance des espèces bactérienne est également observée durant les traitements, résultant par une diminution de

l'abondance des *Bacteroidetes* (exemple : *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Actinobacteria* et *Verrucomicrobia*) et une augmentation des *Firmicutes* (exemple : *Clostridium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*) comparativement aux échantillons disponibles au diagnostic [245, 251]. Lorsque comparés à des sujets sains, les survivants de la LLA pédiatrique présentent une dysbiose intestinale qui se manifeste par une α -diversité nettement réduite, un marqueur indiquant la diversité microbienne, soit le nombre d'espèces différentes dans un échantillon donné, des différences au niveau de l'abondance de certains phylums (*Bacteroidetes* et *Ruminococaceae* and *Lachnospiraceae*, *Faecalicabacterium*) et une β -diversité distincte, se définissant par la comparaison de la biodiversité de deux ou plusieurs communautés bactériennes, et ce dans la première année [251], 5 ans [252] et même 18 ans après la fin des traitements [253]. Curieusement, le profil bactérien coïncide avec celui identifié chez les individus souffrant de maladies inflammatoires de l'intestin [254] et corrèle négativement avec les niveaux d'IL-6 et de CRP [253].

Donc, la dysbiose intestinale observée dans les études pendant les traitements et chez les survivants de cancer pédiatrique pourrait être associée à un profil bactérien pro-inflammatoire. Toutefois, aucune étude n'a encore évalué l'impact de la dysbiose intestinale et de la production en AGCC fécaux sur le développement des complications métaboliques chez ces individus. Puisque la dysbiose intestinale et un changement dans la production des AGCC ont été associés à des désordres métaboliques dans la population générale, plus d'études sont nécessaires pour élucider cette relation chez les survivants de cancer pédiatrique.

2.3.6.3 Habitudes alimentaires et qualité nutritionnelle

2.3.6.3.1 Lien entre les habitudes alimentaires et les complications cardiométaboliques

Le lien entre les mauvaises habitudes alimentaires et le développement de maladies chroniques est bien documenté dans la littérature. En effet, la pauvre qualité nutritionnelle, soit la consommation élevée de grains raffinés, de sel, de sucre ajouté, de gras saturés et d'aliments

ultra-transformés, est un facteur déterminant dans l'étiologie des MCV, du DBT2 et de l'obésité [255-257].

2.3.6.3.2 Habitudes alimentaires des survivants de cancer pédiatrique comparées à des recommandations nutritionnelles

Plusieurs études ont comparé les habitudes alimentaires des survivants de cancer pédiatrique à différents scores nutritionnels et recommandations nutritionnelles. Notre laboratoire a mené une étude ayant pour objectif d'évaluer la qualité nutritionnelle de l'alimentation chez 241 survivants de la cohorte PETALE (âge médian: 21.3 ans, temps moyen post-traitement: 12.9 ans) [137]. Des questionnaires de fréquences ont été utilisés pour calculer 5 scores nutritionnels différents, soit MEDAS (Mediterranean Diet Adherence Screener), et le KIDMED (Mediterranean Diet Quality Index for children and adolescents), servant à évaluer l'adhérence à l'alimentation de type méditerranéen, le HDI-2018 (Healthy Diet Indicator), basé sur les lignes directrices émises en 2003 par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et mises à jour en 2018, le HEI-2015 (Healthy Eating Index), évaluant l'adhérence aux lignes directrices alimentaires américaines et le E-DII (Energy-Adjusted-Dietary Inflammatory Index), utilisé pour évaluer l'aspect pro-inflammatoire de la diète. La classification NOVA a également été utilisée pour déterminer la proportion d'aliments ultra-transformés présents dans l'alimentation des sujets en classifiant les aliments en 4 groupes; (groupe 1 : les produits non transformés ou minimalement transformés, groupe 2 : les ingrédients culinaires, groupe 3 : les produits transformés et groupe 4 : les produits ultra-transformés. En résumé, ils ont démontré que les survivants ont une faible adhésion aux recommandations nutritionnelles et que les produits ultra-transformés constituaient en moyenne plus de 50% de l'énergie totale consommée par jour, selon la classification NOVA. De plus, *Berdan et al.* ont comparé les habitudes alimentaires de 413 survivants (âge moyen: 28.4 ans, temps moyen post-diagnostic: 18.5 ans) aux lignes directrices nutritionnelles de la Société américaine du cancer et ont conclu qu'un faible pourcentage des sujets respectaient les recommandations concernant la consommation de fibres (14 g/1 000 calories par jour) (10.2%) et de fruits et légumes (≥ 5 portions par jour) (17.7 %) [258]. *Robien et al.*, quant à eux, ont comparé les habitudes alimentaires de 72 survivants de la LLA pédiatrique (âge moyen : 29.9 ans, temps moyen depuis le diagnostic: 24.8

ans) à d'autres recommandations nutritionnelles (guide alimentaire de l'USDA (2005), prévention du cancer WCRF/AICR (2007) et la diète DASH) [259]. Brièvement, chacune de ces recommandations suggère de consommer des sources de protéines maigres, préférablement des viandes blanches, du poisson et des sources de protéines végétales en plus d'éviter la viande rouge, de consommer avec modération du gras et de privilégier les gras monoinsaturés et polyinsaturés, d'éviter les aliments à teneur élevée en sodium, d'éviter le sucre ajouté et de consommer avec modération de l'alcool. Ils ont démontré qu'ils avaient un apport moyen excessif en sodium et en sucres ajoutés, un apport moyen faible en fibres et que plus de la moitié des sujets consommaient 2 à 3 portions de fruits et légumes par jour, mais aucun n'atteignaient ≥ 5 portions quotidiennes, selon les recommandations nutritionnelles de la diète DASH et du guide alimentaire de l'USDA [259]. Dans le même ordre d'idées, *Zhang et al.* ont analysé les habitudes alimentaires de 22 jeunes survivants de cancer pédiatrique (âge moyen : 11.7 ans, temps médian post-diagnostic : 5.6 ans) en utilisant le score HEI-2010 (2010 Healthy Eating Index), évaluant l'adhérence aux recommandations nutritionnelles américaines [260]. Les survivants avaient un score moyen de 52.7 sur 100, suggérant une faible adhérence aux recommandations nutritionnelles américaines. D'ailleurs, des analyses sur les groupes alimentaires et les nutriments ont démontré qu'ils consommaient moins de fibres, plus de gras saturés et de sel, moins de potassium, de calcium et de plusieurs vitamines (D, E, K) que l'apport recommandé [260]. Finalement, il a été observé dans une cohorte de 74 survivants de cancer pédiatrique (âge moyen : 14.9 ans, temps moyen post-traitement : 9.4 ans) qu'un grand pourcentage d'entre eux ne consommaient pas suffisamment de calcium (61%), de magnésium (46%), de folate (38%) et d'iode (38%) pour subvenir à leurs besoins nutritionnels [261].

2.3.6.3.3 Habitudes alimentaires des survivants de cancer pédiatrique comparées à des contrôles

Une récente étude australienne a comparé les habitudes alimentaires de 65 de jeunes survivants (temps moyen post-diagnostic: 4 ans), à un groupe d'enfants contrôles et appariés pour l'âge. Un indice de qualité nutritionnelle plus faible et une sélectivité alimentaire plus importante ont été constatés dans le groupe des jeunes survivants [262]. En effet, il a été démontré que les

traitements affectent le goût et l'odorat et pourraient avoir un impact sur les habitudes alimentaires à long terme [263-266]. Cependant, plusieurs autres facteurs influencent les choix alimentaires, notamment l'environnement physique et social, les facteurs intrinsèques (aspect psychologique, expériences ultérieures, caractéristiques biologiques) et cognitifs (connaissances et habiletés), la culture et les ressources économiques [267].

2.3.6.3.4 Habitudes alimentaires des survivants de cancer pédiatrique comparées à la population générale

Peu d'études se sont intéressées à la comparaison des habitudes alimentaires des survivants de cancer pédiatrique et celles de la population générale. Une seule étude s'est penchée sur la question en comparant les scores AHEI de qualité nutritionnelle (Alternative Healthy Eating Index) d'une cohorte de survivants de cancer pédiatrique à deux larges cohortes représentant la population générale (cohortes Bus Santé et CoLaus) [268]. De façon globale, les habitudes alimentaires des survivants et de la population générale témoignent d'une faible qualité alimentaire. Effectivement, les mêmes tendances étaient observées, soit une consommation excessive de gras saturés et de sodium, un apport faible en fibres et un score AHEI similaire [268].

2.3.6.3.5 Lien entre les habitudes alimentaires et les complications cardiométaboliques chez les survivants de cancer pédiatrique

Puis, certaines études ont évalué l'association entre habitudes alimentaires des survivants de cancer pédiatrique et leur santé cardiométabolique. En effet, une consommation élevée de produits ultra-transformés a été reliée à des niveaux de HDL-c bas, et de TG élevé [137]. Une association positive a été établie entre le score E-DII, associé à une diète plus pro-inflammatoire, et un HOMA-IR élevé, des niveaux de HDL-c à jeun faibles et un risque accru d'avoir ≥ 2 facteurs de risques cardiométaboliques [137]. De plus, une association négative a été démontrée entre une meilleure adhérence aux principes nutritionnels de la diète méditerranéenne (selon le score Mediterranean Diet Score) et l'adiposité viscérale et sous-cutanée, le tour de taille, et le risque de SM dans un échantillon de 117 survivants (âge médian : 23 ans, temps moyen post-

traitement : 17.5 ans) [269]. Donc, on peut conclure que la faible adhérence aux recommandations nutritionnelles est associée à un impact négatif sur la santé cardiométabolique dans cette population.

Bien que les survivants de cancer pédiatrique ne mangent pas moins bien que la population générale, on observe qu'ils développent plus de complications cardiométaboliques. En plus, il a été démontré que l'adoption d'habitudes alimentaires plus saines a un effet protecteur chez ces individus. Donc, la nutrition est un levier important dans l'amélioration de la santé cardiométabolique chez les survivants de cancer pédiatrique.

2.4 Souris NSG

2.4.1 Modèle murin pour la recherche sur le cancer

La souris NOD/SCID/gamma c- (NSG), originaire d'un croisement entre une souris ayant une mutation menant à une suppression totale du gène de la chaîne gamma du récepteur IL2 (*Il2rg^{null}*) et la souris NOD/Shi-scid [270], est un modèle de choix pour étudier la pathogenèse du cancer humain, tels que le mélanome [271], la leucémie [272] ainsi que les cancers du pancréas [273], cervical [274], pulmonaire [275] et du sein [276]. Cette lignée est également utilisée dans la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques et individualisées, notamment pour les cancers avec un pronostic défavorable et réfractaire aux traitements actuels [277, 278].

Ces souris génétiquement modifiées ont une déficience en lymphocytes B et T, en cellules NK et en cellules dendritiques, correspondant aux cellules présentatrices d'antigènes [273, 277, 279]. D'ailleurs, il a été démontré que l'évolution des tumeurs cancéreuses dans un modèle murin est inversement proportionnelle au degré d'immunité de l'hôte [270, 280]. Dues à leur multidysfonction immunitaire, les souris NSG sont des hôtes de choix pour recevoir et permettre l'étude d'une xénotransplantation de cellules cancéreuses humaines [270, 272, 277].

Effectivement, cette immunodéficiencia réduit le risque de rejet de la greffe et permet une évolution plus rapide de la maladie. Lorsque comparée aux autres types de souris immunosupprimées (Nude, SCID, NOD/SCID, NOD-SCID- $\beta 2^{-/-}$ (NSB), NOD/Shi-SCID IL2rg^{tm1sug}/Jic (NOG), Rag2^{tm1Fwa}||2rg^{tm1Sug} RG [278]), la souris NSG est un meilleur outil *in vivo* pour potentialiser la progression tumorale [270, 277, 279]. De plus, plusieurs études ont établi que l'évolution de la xénogreffe dans ces souris reproduit bien les caractéristiques de la leucémie originale [281, 282]. Elles ont également une espérance de vie suffisamment longue, ce qui est avantageux pour étudier l'état de survivance post-traitement [283]. Puis, bien que les souris NSG soient résistantes à développer de la résistance à l'insuline [284], il a été démontré qu'elles peuvent accumuler du gras lorsque soumises à une diète riche en gras [285].

Donc, ce modèle murin de souris immunodéficiente a été choisi, car il permet d'induire la leucémie avec une évolution tumorale ressemblant à la cinétique originale, d'isoler les effets d'un agent chimiothérapeutique, de provoquer des complications métaboliques et d'étudier les mécanismes potentiels contribuant à ces complications.

Chapitre 3 – Problématique, hypothèses et objectifs

3.1 Problématique

La LLA représente le cancer le plus prévalent chez les enfants. Bien que la majorité de ces enfants parviennent à la rémission due aux récentes améliorations des méthodes de traitements, cette épreuve n'est pas sans conséquences. Effectivement, les survivants de cancer pédiatrique sont à risque de développer des complications cardiométaboliques. Parmi ces comorbidités, on observe l'obésité, la dyslipidémie, des perturbations du métabolisme glucidique et les MCV [4, 134].

Afin d'expliquer ce phénomène, certaines hypothèses ont été émises dans la littérature. Plusieurs études ont constaté que la maladie et les traitements induisent un stress oxydatif et de l'inflammation [12, 17, 186, 193], perdurant même après la fin des traitements [136]. Cet état pro-oxydant et pro-inflammatoire favoriserait la progression de maladies chroniques [167, 183]. De plus, la dysbiose intestinale, se manifestant par un déséquilibre de la composition et de la diversité microbienne, une fragilisation de la barrière intestinale et une diminution de la production des AGCC, provoquerait une endotoxémie métabolique, ce qui affecterait négativement l'homéostasie du métabolisme des lipides et des glucides [213, 221]. Dans la population générale, ces modulations sont reliées à plusieurs maladies métaboliques, comme l'obésité, la RI et le DBT2 [23, 220].

À ce jour, peu de données probantes sont disponibles quant aux facteurs contribuant à l'installation de ces désordres cardiométaboliques chez une population de survivants de cancer pédiatrique.

Le but principal de ce projet de recherche est d'explorer les mécanismes impliqués dans la genèse des complications cardiométaboliques chez les survivants de la LLA, en s'intéressant spécifiquement à la maladie, au MTX et au microbiote intestinal.

Pour ce faire, l'utilisation d'un modèle murin xénogénique de la LLA était nécessaire. La faisabilité de l'expérience ainsi que la sélection de la souche du blaste servant à induire la LLA pédiatrique ont été testées en phase exploratoire. Cet aspect est discuté plus en détail dans le **chapitre 4 - Méthodologie** du mémoire. Les résultats présentés dans ce mémoire découlent de ces travaux et servent à mettre en lumière l'impact de la maladie et du MTX sur les paramètres métaboliques et sur le microbiote intestinal des souris.

3.2 Hypothèses

Nous proposons que la maladie seule causera des modifications du microbiote intestinal et des désordres du métabolisme des glucides et des lipides à court et long terme. Nous suggérons que le MTX provoquera des changements de plus grande envergure pour ces paramètres. Nous pensons que les femelles développeront plus de désordres métaboliques que les mâles, tel qu'observé chez les humains.

3.3 Objectifs

3.3.1 Objectif principal

L'objectif principal de ce travail est d'établir une relation de «cause-effet» entre la LLA pédiatrique, les traitements de la LLA et le développement de complications métaboliques (obésité, dyslipidémie, RI) chez les souris NSG greffées avec une souche de blastes d'un patient nouvellement diagnostiqué préalablement sélectionné dans une étude pilote.

3.3.2 Objectifs spécifiques

Spécifiquement, nous désirons:

- 1- Évaluer les effets à court et long terme de la LLA pédiatrique et/ou du MTX sur les issues métaboliques (poids, dyslipidémie, RI) et sur des protéines clés impliquées dans le métabolisme énergétique, glucidique et lipidique.
- 2- Évaluer l'impact de la LLA pédiatrique et/ou du MTX sur la composition et la diversité du microbiote intestinal et sur le contenu fécal en AGCC.
- 3- Investiguer l'association entre les issues métaboliques et le microbiote intestinal (composition et diversité) et/ou le contenu fécal en AGCC.
- 4- Comparer la réponse métabolique des mâles et des femelles aux conditions expérimentales pour tous les éléments mentionnés ci-haut.

Chapitre 4 – Méthodologie

Cette section résume la méthodologie utilisée pour répondre aux objectifs du mémoire. Les détails du matériel utilisé et de la méthode sont disponibles dans la section *Methods* de l'article intégral du **Chapitre 5**.

4.1 Modèle murin

La lignée de souris immunodéficiente NSG (n=40) a été utilisée dans le cadre de ce projet de recherche. Tous les animaux avaient un accès illimité à de l'eau et de la nourriture de type Chow (18.6% en protéines, 44.2% en glucides et 6.2% en lipides) correspondant à une diète normale pour ces rongeurs et étaient maintenus dans des conditions stériles. Un schéma illustrant le protocole expérimental est présenté à la **Figure 5**. Le Comité scientifique du Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine (CRCHUSJ) ainsi que le Comité institutionnel de bonnes pratiques animales en recherche (CIBPAR) du CRCHUSJ ont autorisé cette étude.

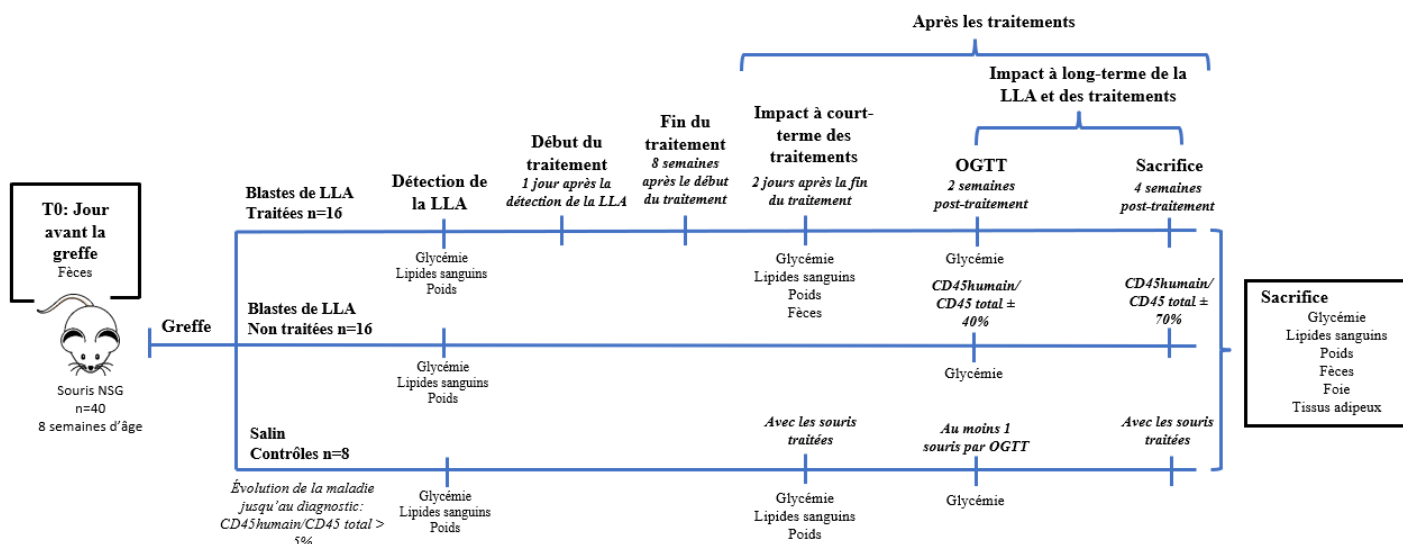


Figure 5. – Schématisation des étapes du protocole expérimental et de la collecte des données

(Créée avec Power Point).

4.2 Taille de groupe

La taille de groupe a été établie à 16 par groupe pour les groupes recevant la greffe de blastes en se basant sur une étude similaire menée par notre laboratoire (n=10 par groupe) [286] tout en considérant les variations interindividuelles dans le développement de complications métaboliques et le risque de décès prématuré relié à la progression tumorale et au développement de ces complications. La taille du groupe contrôle a été établie à 8 souris afin de réduire le nombre de souris utilisées pour des raisons éthiques. Le paramètre primaire était d'observer l'impact de la maladie et du méthotrexate sur les paramètres biochimiques et le paramètre secondaire était d'observer l'impact de ses deux variables sur le microbiote, les AGCC fécaux et l'expression de certaines protéines hépatiques impliquées dans le métabolisme des glucides et des lipides.

4.3 Xéno greffe de LLA pédiatrique

Une greffe de blastes a été effectuée pour induire la maladie chez les souris NSG. En collaboration avec le laboratoire du Dr Élie Haddad, des blastes amplifiés de LLA pédiatrique ont été obtenus de la banque de cellules amplifiées de patients nouvellement diagnostiqués du Département d'Hémo-oncologie du CRCHUSJ. La sélection de la souche de blastes a été préalablement testée en phase exploratoire menée par Sophia Morel, dans le cadre de ses travaux de doctorat dans le laboratoire de Dr. Levy et Dre Marcil, au CRCHUSJ. Huit souris NSG ont reçu une greffe de blastes de patients nouvellement diagnostiqués provenant de 3 souches différentes et 2 souris contrôles ont été greffées avec du salin. Ensuite, 5 des 8 souris greffées avec la LLA ont été traitées avec du MTX, dans le but de diminuer le niveau de cellules leucémiques en circulation [287]. Les résultats de l'étude pilote ont grandement orienté le choix du type de blaste et nous a permis de sélectionner une souche de blaste avec une cinétique de la maladie entre 30 et 90 jours et qui répondait bien au traitement de MTX (cellules leucémiques < 20% 4 semaines après la fin des traitements). Le choix du type de blastes a également été effectué en tenant compte du type de cellule (pré-B LLA) et d'une absence de rechute ou d'apparition de cancer secondaire chez le patient duquel les cellules ont été prélevées.

Pour la présente étude, à 8 semaines d'âge, 32 souris (non traitées = 16, traitées = 16) ont été greffées avec les blastes en suspension dans du PBS. Les 8 souris restantes faisaient partie du groupe contrôle et ont été greffées seulement avec du PBS.

4.4 Évolution de la maladie

Des prises de sang par la veine saphène ont été effectuées hebdomadairement dans le but de surveiller les niveaux de CD45 humains circulants, indicateur utilisé pour suivre l'évolution de la maladie. Après avoir procédé à la lyse des globules rouges, les leucocytes ont été colorés avec des anticorps conjugués à un ou des fluorochromes suivants : FITC anti-mouse CD45, APC anti-human CD45, PE Mouse anti-human CD19 et Pe-Cy7 Mouse anti-human CD10. Le 7-Amino-Actinomycin-D a été également utilisé pour identifier les cellules mortes. Ensuite, des perles de comptage ont été ajoutées au mélange afin d'estimer le nombre de cellules leucémiques dans les échantillons par la technique de cytométrie en flux à l'aide l'appareil BD FACS Cantoll et du logiciel d'analyse Diva (BD Bioscience, Mississauga ON, CAN). La leucémie était détectée lorsque les CD45 humains s'élevaient à plus de 5%.

4.5 Traitement au méthotrexate

Une fois la leucémie détectée dans le sang chez les souris appartenant au groupe traité (n = 16, n = 8 mâles et n = 8 femelles), 5 mg/kg de MTX dilué dans du PBS stérile a été administré par injection intrapéritonéale. Le protocole de traitement comportait 4 jours consécutifs d'injections, toutes les 2 semaines pendant 8 semaines. Les 16 autres souris greffées avec la LLA n'ont pas reçu de traitement, car elles appartenaient au groupe des souris non traitées, servant à déterminer l'impact de la maladie seule. Les souris contrôles n'ont également pas reçu de traitement de MTX.

4.6 Profil glycémique

La glycémie à jeun a été mesurée à différents moments durant le protocole expérimental, soit au diagnostic (3 groupes), dans la phase court-terme après les traitements (souris traitées et contrôles) et au sacrifice (3 groupes). Nous avons également réalisé un test d'hyperglycémie orale provoquée (OGTT) pour évaluer la RI. Après un jeûne de 6 heures, une solution de dextrose 50% (2 µl/g de poids corporel) a été administrée par gavage. Ensuite, la glycémie a été mesurée au temps 0, 30, 90, 120 minutes. L'OGTT a été effectué chez les souris traitées 2 semaines suivant la fin des traitements ou lorsque les niveaux de CD45 humains se situaient autour de 40% pour les souris non traitées, afin de s'assurer d'avoir 2 semaines entre cette procédure et le sacrifice et ainsi éviter des décès prématurés. Les souris contrôles ont été réparties afin d'avoir au moins une souris de ce groupe à chaque test exécuté.

4.7 Sacrifice

Avant de procéder à l'anesthésie avec l'isoflurane 3-5%, les souris ont été pesées, la glycémie a été mesurée et un échantillon de selles a été collecté. Les animaux, après un jeûne de 6h, ont été sacrifiés par ponction cardiaque, suivie d'une dislocation cervicale. Le sang total a été collecté lors de la ponction cardiaque dans des tubes enduits d'EDTA et immédiatement conservés sur glace. Ensuite, les échantillons sanguins ont été centrifugés (2200 g, 20 min, 4°C), aliquotés et conservés à -80°C à des fins d'analyses biochimiques. Plusieurs organes ont été prélevés, tels que le foie, les intestins et le tissu adipeux et conservés à très basse température (-80°C) pour éviter leur dégradation. Le sacrifice a été planifié 4 semaines après la fin du protocole de traitement pour les souris traitées ou lorsque les CD45 humains en circulation atteignaient environ 70% pour les souris non traitées, afin d'éviter des décès prématurés. Les souris contrôles ont été sacrifiées en même temps que les souris traitées.

4.8 Profil lipidique et biochimique

Les TG, le CT et le HDL-c à jeun ont été mesurés dans le plasma obtenu au diagnostic, dans la phase court-terme après les traitements ainsi qu'au moment du sacrifice. Les TG et le CT ont également été dosés dans le foie et le jéjunum, à la suite d'un processus d'isolation et de purification selon la méthode de Folsh, décrite précédemment [288].

4.9 Évaluation du microbiote intestinal

À 7 semaines d'âge, les souris ont été placées dans des cages communes de manière aléatoire avec l'objectif d'homogénéiser le microbiote intestinal. Une semaine plus tard, les animaux ont été séparés dans des cages individuelles pour faciliter la collecte de selles tout au long de l'expérience. Des échantillons fécaux ont été recueillis avant la greffe de blastes (tous les groupes), dans la phase court-terme après les traitements (groupe traité) et au sacrifice (tous les groupes) et gardés à -80°C pour des analyses futures.

L'ADN microbien a été extrait et la région 16S V4 a été séquencée à l'aide de la plateforme Illumina (San Diego, CA, USA) par notre collaborateur Dr Stintzi. L'analyse de la composition et de la diversité microbienne a été réalisée telle que préalablement décrite dans plusieurs publications de l'équipe de Dr Stintzi [289, 290]. Brièvement, les données relatives au microbiote intestinal ont été obtenues à la suite d'une analyse bio-informatique comprenant : (1) la filtration des lectures pour garantir la qualité des données; (2) la création de groupes d'unités taxonomiques opérationnelles (OTU); (3) l'évaluation des résultats avec l'outil Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) et; (4) la génération du fichier en lien avec l'arbre phylogénétique.

Les résultats ont permis d'acquérir de l'information sur la taxonomie (bactéries, genre, phylum), sur l'abondance relative des différents phyla, sur l' α -diversité (indices Shannon et Chao1) et la β -

diversité. Les données issues de l'analyse bio-informatique tel que décrit ci-haut ont été analysées statistiquement via le site internet MicrobiomeAnalyst (McGill, Montréal, Qc, CAN).

4.10 Détermination du contenu fécal en acides gras à chaînes courtes

Les AGCC ont été mesurés dans les échantillons de selles par chromatographie liquide avec spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) à la plateforme analytique du CHUM (Montréal, Qc, CAN). 20 mg de matériel fécal ont été utilisés pour effectuer cette analyse. Les AGCC ont été quantifiés et normalisés selon le poids humide des échantillons en utilisant la méthode de dilution isotopique préalablement décrite [291]. Les échantillons ont été homogénéisés dans une solution de 50% acétonitrile et d'eau à une concentration de 1 mg/30 μ L. 30 μ L de cet homogénat a été mélangé à des calibrateurs, correspondant à des standards purs dilués dans une solution d'eau et de 50% d'acétonitrile et à 10 μ L d'un mélange de standards internes incluant l'acétate-d4, le propionate-d5, l'isobutyrate-d7, le butyrate-d2, l'isovalérate-d2 et le valérate-d2 dans un tube. Ensuite, la dérivation des acides carboxyliques a été effectuée avec de la 3-nitrophénylhydrazine mélangée à une solution de 50% d'acétonitrile et d'eau pour atteindre un volume final de 80 μ L. Les échantillons ont à nouveau été dilués pour atteindre un volume de 2 mL. De ce nouveau volume, 5 μ L a été analysé par chromatographie liquide avec spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) avec une colonne HPLC C18. La quantification des analytes a été basée sur une courbe de calibration à 10 points.

4.11 Expression protéique

La technique de Western blot a été utilisée afin de mesurer l'expression protéique de plusieurs protéines hépatiques impliquées dans le métabolisme du glucose et des lipides, telles que la protéine kinase α AMP-dépendante (AMPK α) et sa forme phosphorylée (P-AMPK α), la P38-MAPK et sa forme phosphorylée (P-P-38-MAPK), l'AKT et sa forme phosphorylée (P-AKT), l'acide gras synthase (FAS), la carnitine palmitoyl transférase 1 isoforme A (CPT1A), l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et sa forme phosphorylée (P-ACC).

4.12 Analyses statistiques

Les données sur les paramètres biochimiques, l'expression protéique et les AGCC fécaux sont exprimées en moyenne \pm SEM. Pour les comparaisons entre 2 groupes, le test de t de Student a été utilisé et le test de Wilcoxon a été utilisé s'il y avait une disparité entre la conclusion des deux tests. Pour les comparaisons entre les moyennes totales ainsi que les moyennes des femelles et des mâles entre 3 groupes, l'analyse de variance (ANOVA) suivie d'un test post-hoc de Scheffé a été utilisée et le test de Kruskal-Wallis a été utilisé s'il y avait une différence dans la conclusion des deux tests. Les analyses sur les données du microbiote intestinal et des AGCC du groupe traité en longitudinal (T0 vs phase court-terme après les traitements vs sacrifice) a été effectué avec une ANOVA à mesures répétées ou avec les tests de Friedman et de Wilcoxon s'il y avait une disparité entre la conclusion des deux tests.

Concernant le microbiote intestinal, les données reliées à l'abondance relative des phyla, des classes, des ordres, des familles et des genres bactériens et à l' α -diversité ont été traitées de la même manière que les données mentionnées ci-haut. La β -diversité a été évaluée avec une analyse de variance permutacionnelle (PERMANOVA). Pour l'ensemble des analyses statistiques, une valeur $p \leq 0,05$ était considérée statistiquement significative.

Chapitre 5 – Résultats

La section suivante présente l'article intégral et les résultats collectés pour répondre aux objectifs mentionnés dans le **chapitre 3**. Cet article en cours de révision par les coauteurs pour soumission à *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*.

5.1 Contribution de l'étudiante

L'étudiante a contribué à la collecte de données, aux analyses biochimiques et statistiques, à l'interprétation des résultats ainsi qu'à la rédaction de l'article scientifique présenté dans le **chapitre 5** du mémoire. Les différentes étapes de ce projet de recherche ont été menées avec l'appui de Sophia Morel et Véronique Bélanger, assistantes de recherche et de Dre Valérie Marcil, chercheuse au CRCHUSJ et superviseuse de l'étudiante. L'article scientifique est en cours de révision par les auteurs-collaborateurs, énumérés en en-tête.

5.2 Article intégral

Childhood acute lymphoblastic leukemia and methotrexate treatment induce glucose and lipid metabolism alterations, with potential associations with gut microbiota and short-chain fatty acids.

Normandeau, C.^{1,2}, **Morel, S.**¹, **Benmoussa, A.**¹, **Bélangier, V.**¹, **Béland, K.**¹, **Stintzi, A.**⁴, **Haddad, E.**^{1,3}, **Levy, E.**^{1,2}, **Marcil, V.**^{1,2}

¹Research Center of the Sainte-Justine University Hospital Center, Montreal, Quebec, Canada.

²Department of Nutrition, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

³Department of Pediatric, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

⁴Ottawa Institute of Systems Biology, Department of Biochemistry, Microbiology and Immunology, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada.

Abstract.

Background. Although survival in childhood acute lymphoblastic leukemia (cALL) has significantly improved with advancements in treatment, survivors face an elevated risk of developing cardiometabolic comorbidities compared to the general population. Despite this knowledge, the precise mechanisms underlying the development and progression of these complications remain poorly understood. The present study, using a xenogeneic mouse model, primarily aims to discern the distinct impacts of cALL and methotrexate treatment on metabolic outcomes. Additionally, it seeks to investigate the potential association of the metabolic alterations with gut microbiota and its metabolites.

Methods. Forty NSG mice, maintaining a balanced male-to-female ratio were either grafted with cALL blasts obtained from a donor and amplified in mice (patient-derived

xenograft; ALL-graft mice, n=32) or received PBS as controls (n=8). Among the ALL-graft mice, Among the ALL-graft mice, half were subjected to methotrexate treatment (5 mg/kg) for 4 consecutive days over 8 weeks, while the remaining served as non-treated controls (n=16 per group). Various assessments were conducted at distinct time points throughout the study, including the collection of peripheral blood, weight measurements, and fecal samples. An oral glucose tolerance test (OGTT) was performed to evaluate glucose intolerance. Tissues (liver, intestine, adipose tissue) were harvested upon sacrifice. Gut microbiota composition/diversity–and fecal short-chain fatty acid (SCFA) content were measured. Differences in study parameters were compared across groups (control vs. treated ALL-graft vs. non-treated ALL-graft mice) and were stratified based on sex.

Results. In comparison to female control mice, the onset of the disease in female ALL-graft mice was associated with elevated total cholesterol levels in both plasma (1.83 mmol/L vs 1.98 mmol/L, p=0.05) and liver (1.21 mg/g vs. 1.93 mg/g, p=0.008). In parallel, metabolic pathways suggesting an impact on β -oxidation were identified, showcasing an increased expression of phosphorylated AMPK/AMPK ratio and decreased FAS in the liver of non-treated ALL-graft mice compared to controls. Moreover, methotrexate treatment was associated with acute and long-term metabolic perturbations, including a higher glycemic profile and elevated HDL-c levels), along with gut microbiota dysbiosis characterized by lower β -diversity and reduced fecal SCFA content) in female ALL-graft treated mice.

Conclusion. Our findings indicate that the ALL itself triggered changes in lipid metabolism. Methotrexate exacerbated these perturbations and induced dysglycemia in female mice. The observed alterations in key hepatic proteins related to glucose and lipid metabolism, modifications of gut microbiota composition and fecal SCFA content emerged as potential mechanisms contributing to the heightened metabolic complications noted in females with ALL following methotrexate treatment.

Keywords: pediatric cancer, acute lymphoblastic leukemia, methotrexate, NSG mouse, cardiometabolic complications, dyslipidemia, insulin resistance, gut microbiota, short-chain fatty acids

Introduction

Childhood acute lymphoblastic leukemia (cALL) stands as the predominant pediatric cancer, representing over 80% of leukemia cases diagnoses in children [1, 2]. This hematological cancer is characterized by a disruption in lymphocyte differentiation, leading to the accumulation of immature lymphoid cells in the bloodstream and their infiltration into vital tissues such as the bone marrow and the spleen. Consequently, the functionality of the hematopoietic system is compromised, manifesting in symptoms observed at diagnosis, including shortness of breath, fever, susceptibility to bruising or bleeding weakness, and bone pain [2, 3]. Treatments for cALL are complex and comprise various therapeutic modalities mainly based on chemotherapy, with potential adjuncts, include cranial radiation and allogeneic hemopoietic stem cell transplantation.

The treatment protocol for cALL is essentially divided into 3 phases -induction, consolidations and maintenance- each combining multiple drugs with different mechanisms of action [3, 4]. Among them, methotrexate is used in the consolidation and maintenance phases. Functioning as an antimetabolite agent, methotrexate acts as an inhibitor of the dihydrofolate reductase (DHFR), a pivotal enzyme in nucleotide synthesis [5-7].

Thanks to the advancements in treatment protocols over the last decades, the 5-year event-free survival rate of cALL and chronic lymphoid leukemia has reached an impressive 94.4% (95% confidence intervals: 93.0–95.6) based on 2016-2020 data in Canada [1, 8]. Despite these significant strides, cALL survivors are at higher risk of enduring long-term health complications, particularly in the realm of cardiometabolic sequelae [9]. Pediatric

cancer survivors are up to twice as likely as their siblings to be diagnosed with hypertension, dyslipidemia, and type 2 diabetes [10], and up to seven times more likely to experience cardiac conditions [11]. Research, including our own and others has shown the heightened faced by young cALL survivors compared to the general population, revealing correlations with the metabolic syndrome, dyslipidemia, insulin resistance, hypertension, and augmented low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-c) [12-17]. Notably, some biological factors, including the sex, have been linked to the development of these complications. Studies have reported that female survivors are more prone to developing dyslipidemia [18], cardiovascular diseases [11] and obesity [19], compared to their male counterparts. Metabolic health can also undergo acute impacts during treatment, thereby influencing pathways such insulin signaling [20] and lipid homeostasis [21]. Throughout ALL treatment, many children exhibit high glycemia, glucose intolerance and insulin resistance [22, 23], necessitating insulin injections in certain cases [24-26]. Furthermore, some children with ALL developed dyslipidemia, characterized by hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, and reduced high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-c) levels at diagnosis and during treatment [27-31]. Despite the evident disruptive nature of the acute and late side effects, their mechanisms remain unknown.

Several theories have been proposed to explain the emergence of cardiometabolic complications during and after cALL. The inflammatory and oxidative processes [32, 33] associated with cancer itself create a favorable environment for the progression of metabolic disorders. Metabolic disorders, including elevated blood pressure [34], dyslipidemia [35], obesity [36] and hyperglycemia [37] are among the metabolic disorders observed at diagnosis of cALL supporting the hypothesis that the disease actively contributes to their manifestation. Modulation of the gut microbiota has also been suggested as a potential contributor to low-grade inflammation and cardiometabolic diseases in the general population [38-40]. Intestinal dysbiosis, marked by changes in composition and diversity of bacterial communities, can lead to increased in permeability of the intestinal barrier. This modification results in the translocation of endotoxins into

the systemic circulation, triggering the release of pro-inflammatory cytokines and oxidative stress biomarkers [41-43]. The integrity of the intestinal barrier is substantially linked to short-chain fatty acids (SCFA), produced by certain colonic bacteria. Noteworthy, SCFA are microbial metabolites crucial for the colon cell energy, promotion of commensal bacteria, and regulation of inflammatory processes essential for intestinal homeostasis [44]. SCFA derived from gut microbiota also exert extra-intestinal functions such as the modulation of the expression of certain genes involved in energy metabolism, including liver lipogenesis and glycogenesis in the liver [44, 45]. Methotrexate-based regimen have been associated with gut barrier integrity [46] and changes in bacteria composition and abundance both *in vitro* and *in vivo* [47]. Nevertheless, the precise link between gut dysbiosis and the development of cardiometabolic complications in cALL survivors remains not fully understood.

Because of the numerous confounding factors, isolating the individual impact of leukemia and methotrexate treatment proves challenging in a clinical setting. Therefore, to enhance our understanding of these parameters but also of acute and late metabolic disruptions, the utilization of preclinical animal models is necessary. NSG mice have demonstrated efficacy in successfully growing tumorous cancers [48-51]. The main feature of NSG mice lies in their lack of an immune system, resulting in a deficiency in T and B lymphocytes, natural killer (NK) cells and a reduced dendritic cell activity [52]. These immune modifications position NSG as an optimal host for human xenografts, enabling the study of cancer development, tumor growth and systemic impacts with a high degree of relevance to human physiology.

The main objective of this study was to distinguish the individual impacts of cALL and methotrexate treatment (both acute and long-term) on metabolic outcomes, including weight, insulin resistance, dyslipidemia, using a patient-derived xenograft (PDX) model of leukemia. In addition, our goal was to explore alterations in key hepatic protein expression implicated in the energy, glucose, and lipid metabolism. Furthermore, we seek

to investigate the associations between the metabolic outcomes and gut microbiota (both composition and function) as well as SCFA. An essential aspect of the present work involved evaluating sex-dependent metabolic responses to both the disease and the treatment.

Methods

Mice

NSG mice (n=40) were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and bred at the animal facility of the Research Center of Sainte-Justine University Hospital Center (SJUHC) under pathogen-free conditions. Mice were fed with a Chow diet after weaning and had access to food and water *ad libitum*. All procedures were approved by the SJUHC Scientific Committee and the Institutional Committee for Good Laboratory Practice for Animal Research (Protocol #2021-3266). Figure 1 illustrates the study design.

Xenogeneic Model of cALL

ALL amplified blasts were obtained from the amplified cell bank of newly diagnosed ALL pediatric patients of SJUHC Hemato-Oncology Division. Briefly, blasts isolated from a bone marrow aspirate at diagnosis were injected i.v. in NSG mice and amplified. The resulting amplified xenograft were then cryopreserved until use. For this study, one ALL blast was selected to conduct the experiments. In an exploratory phase, selection was based on leukemia immunophenotype (precursor-B cell, which is the most prominent type of ALL), the absence of relapse or secondary cancer, a time-to-leukemia kinetic time of 30 to 90 days in NSG mice and the responsiveness to methotrexate defined by maintenance of leukemic cells below a threshold of 20% (calculated over the total of circulating mouse and human CD45 cells) during a 4-week period after the treatment protocol.

When mice reached 8-week-old, ALL blasts (2.28×10^6 per mice) suspended in 100 μ l of sterile PBS were injected in the caudal vein. A total of 32 mice (n=16 males; n=16 females) were engrafted with ALL blasts. As controls, 8 mice (n=4 males; n=4 females) were

engrafted with PBS only (control mice). After the engraftment procedure, mice were weighted every other day and examined for any visual signs of suffering (lethargy, splenomegaly, curved back, rapid breathing, weight loss).

Assessment of ALL

Blood samples from the saphenous vein were drawn weekly in every mouse to monitor the level of human CD45 as an indicator of disease development, including controls to ensure that no contamination of the PBS group has occurred. Red blood cell lysis in the peripheral blood was performed as a preliminary step to the fluorochrome-conjugated antibodies staining protocol. To assess human CD45, leukocytes were dyed with the following monoclonal antibodies: FITC anti-mouse CD45 (BD Bioscience, Mississauga, ON, CAN), APC anti-human CD45 (Biolegend, CA, USA), PE Mouse anti-human CD19 (Biolegend, CA, USA), and Pe-Cy7 Mouse anti-human CD10 (Biolegend, CA, USA). 7-Amino-Actinomycin-D (BD Bioscience, Mississauga, ON, CAN) was also added to mark dead cells. CountBright beads (ThermoFisher scientific, Waltham, MA, USA) were incorporated to the mix to evaluate the cell count in samples. Leukemic cells were detected using flow cytometry with BD FACS Cantoll and analyzed with Diva software (BD Bioscience, Mississauga, ON, CAN). Development of leukemia was confirmed when circulating CD45 leukemic cells ($[CD45_{human}/CD45_{total}]$) were $> 5\%$. For the control group time-to-leukemia timepoint and its related parameters were determined to match the timelapse of the other two groups (i.e. mean: 52 days after graft, Table 1).

Methotrexate treatment

Once disease was confirmed, methotrexate (5 mg/kg, diluted in PBS) (Accord Healthcare Inc, Kirkland, QC, CAN) was injected in the peritoneal cavity of 16 mice (treated mice, n=8 males, n=8 females). Treatment was administered for 4 consecutive days every two weeks for a total period of 8 weeks to lower percentage of $[CD45_{human}/CD45_{total}]$. A group of mice (n=16) were not treated to study the impact of disease only (non-treated mice, n=8 males, n=8 females).

Glucose homeostasis

Blood samples from the saphenous vein were drawn to measure fasting blood glucose levels with a glucometer (Bayer, Leverkusen, Germany) at the time-to-leukemia (all groups), at acute phase after treatment (control and treated groups), and at sacrifice (all groups) (Figure 1). To assess glucose sensitivity, an oral glucose tolerance test (OGTT) was performed 2 weeks after the end of the treatment protocol (treated group) or when [CD45human/CD45total] reached 40% (non-treated group). For the control group, OGTT was performed in parallel with the two other groups with the objective of assessing at least one control mouse per test scheduled. After a 6-hour fast, 50% dextrose solution was administered orally (2 μ l/g) and glycemia was measured at 0, 30, 90 and 120 minutes.

Sacrifice

Sacrifice was planned 4 weeks after the end of the treatment (treated mice) or when [CD45human/CD45total] reached 70% (non-treated mice). Control mice were sacrificed at the same time as the treated group. Animals were weighted and anesthetized with isoflurane 3-5% and euthanized by cardiac puncture followed by cervical dislocation. Blood was harvested by cardiac puncture in EDTA coated tubes and centrifuged to separate plasma from blood cells (2200 *g*, 20 min, 4°C). Adipose tissue (mesenteric, inguinal, epididymal, perirenal) and organs (liver, jejunum, distal colon) were weighted. A small piece of each organ was placed in Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) lysis buffer for protein analysis purposes and immediately frozen on dry ice. Next, adipose tissue and organs were snap-frozen in liquid nitrogen. Plasma, organs, and stool samples were stored at -80°C until further analysis.

Lipid and biochemical analysis

Triglycerides (TG), total cholesterol (TC) and HDL-c levels were in plasma samples from the time-to-leukemia (all groups), acute phase after treatment (control and treated groups) and sacrifice (all groups) and in organs (liver and jejunum) collected at sacrifice

(all groups). For tissues, the Folch method was executed beforehand to isolate and purify lipids as previously described [53]. Commercial kits were used to quantify TG (TRIGS, Randox Laboratories, Crumlin, UK) and TC (Wako Diagnostics, USA) concentrations in plasma and tissue samples. HDL lipoprotein was isolated from plasma by precipitation using Polyethylene glycol 6000 as previously described [54-56]. 5 μ l of plasma of each mouse was mixed with Polyethylene glycol 6000 (PEG, pH=8) in a ratio 1:1, followed by a 20-minute incubation at room temperature. The mixture was then centrifugated at 2000g for 40 minutes and the upper phase was collected as the HDL-c fraction. Commercial kits for TC (Wako Diagnostics, USA) were used to quantify plasma concentration of HDL-c.

Gut microbiota

When animals reached 7 weeks of age, they were randomly mixed to homogenate gut microbiota. From 8-week-old, mice were separated in individual cages to allow for stool collection. Fresh fecal samples were collected at different time points during the study: day before the graft (T0: all groups), acute phase after treatment (treated group) and sacrifice (all groups) (Figure 1). Upon collection, samples were immediately frozen on dry ice and conserved at -80°C . Microbial DNA was extracted from stool samples with FastDNA Spin Kit (MP biomedical, OH, USA). Gut microbiota composition and diversity were determined by DNA sequencing of the 16SV4 region using the Illumina platform (San Diego, CA, USA) [57, 58]. The microbial community analysis was done according to our published protocol [59] and included: (1) filtering of read to ensure quality using Fastx toolkit, (2) Creation of Operational Taxonomic Units (OTUs) clusters, (3) Taxonomic data assessment with Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) software (4) Generating the phylogenetic tree file [59, 60]. The data were used to obtain information on taxonomic classification, on relative abundance of different phyla present in the samples and expressed as α - (Shannon and Chao1 indexes) and β -diversity.

Dosage of fecal short-chain fatty acids

Twenty mg of fecal material was used to measure SCFA content by LC-MS/MS at the CRCHUM Metabolomics core facility (Montreal, QC, CAN). Among them, acetic, propionic, lactic, butyric, isobutyric, valeric, isovaleric, caproic, succinic acids and total SCFA (the sum of the SCFA listed above) were quantified and normalized by sample wet weight following an isotopic dilution method modified from *Han et al.* [61]. Briefly, samples were homogenized in a solution of 50% acetonitrile in water at a 1mg/30uL concentration. Thirty μ L of the homogenates and calibrators (pure standards diluted in 50% acetonitrile in water) were transferred in a tube with 10 μ L of an internal standard mix containing acetic-d₄, propionic-d₅, isobutyric-d₇, butyric-d₂, isovaleric-d₂ and valeric-d₂. Carboxylic acids were derivatized at 40^oC for 30 minutes using 3-nitrophenylhydrazine in 50% acetonitrile in water in a final volume of 80 μ L. Samples were diluted to obtain a 2 mL volume and 5 μ L of that final volume was analyzed by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using a C18 HPLC column. Analyte/internal standard area ratios were used to quantify the analytes, based on a 10-points calibration curve. Propionic-d₅ was used as an internal standard for propionic, lactic, succinic and caproic acids.

Western Blots

Western blot analysis was used to assess protein expression in the three experimental groups. Homogenization of liver (0.1 g per sample) was done in RIPA solution containing with protease inhibitor tablets (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) and antiphosphatases (PmFS and pepstatin) to avoid protein degradation. The Bradford method was used to determine protein concentration in samples. Twenty μ g of protein was mixed with 2X Laemmli SDS and β -mercaptoethanol sample buffer (Bio-Rad, Mississauga, ON, CAN) and heated at 100^oC for 5 minutes for protein denaturation. Electrophoresis was done on a 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred on a nitrocellulose membrane. Afterwards, the non-specific proteins were blocked with a 5% fat-free milk and TBS-Tween solution. Next, an overnight incubation at 4^oC with the

following primary antibody was achieved: AMP-activated protein kinase α (AMPK α) and its phosphorylated form Phosphorylated AMPK α Thr172 (P-AMPK α), P38-MAPK and its phosphorylated form (P-P-38-MAPK), AKT and its phosphorylated form (P-AKT), Fatty acid synthase (FAS), Carnitine palmitoyl transferase 1 isoform A (CPT1A), Acetyl-CoA carboxylase (ACC) and its phosphorylated form Phospho-Acetyl-CoA Carboxylase (Ser79) (P-ACC), and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The list of the antibody dilution and provenance for each tissue is presented in Supplementary Table 1. ECL chemiluminescence substrate (Bio-Rad, Mississauga, ON, CAN) was poured on the blot prior to the band acquisition with the Chemidoc MP Imaging System and analyzed with Image Lab software (Bio-Rad, Mississauga, ON, CAN). Normalization of the protein of interest was performed using GAPDH as the housekeeping protein. P38-MAPK, AKT, FAS and CPT1A were blotted on the same gel. P-P38-MAPK, AMPK α and ACC were blotted on the same gel. Finally, P-AMPK α and P-ACC were blotted on the same gel. Two different gels were used to determine the total and phosphorylated forms of the above-mentioned proteins, since it is more accurate than stripping method [62] and each were normalized by its respective GAPDH before calculating the [phosphorylated /total form] ratio.

Statistical analysis

For biochemical data, Western blots and SCFA fecal content, data are expressed as mean \pm SEM. For two group comparisons, Student *t*-test was used or Mann-Whitney test, if there was a disparity between the conclusion of the two tests. For three group comparisons, analysis of variance (ANOVA) followed by pairwise post-hoc tests using Scheffe correction for multiple testing was used or Kruskal-Wallis tests, if there was a disparity between the conclusion of the two tests. Intra-sex variations (male vs. male and female vs. female) were performed using ANOVA or Kruskal-Wallis test, if there was a disparity between the conclusion of the two tests. For the treated group, further analysis was done to assess the variation of microbiota and SCFA values during the experiment longitudinally, (T0 vs. acute phase after the treatment vs. at sacrifice) using repeated measures ANOVA or Friedman and Wilcoxon signed rank test was used if there was a

disparity between the conclusion of the two tests. IBM SPSS Statistic 27 (New York, USA) was used to execute these statistical tests. For gut microbiota, comparisons of relative abundance and α -diversity between groups were performed as described above. For β -diversity, data were analyzed with permutational ANOVA (PERMANOVA) using Microbiome Analyst platform (McGill, Montreal, QC, CAN) [63] and are expressed as 2-D Principal Coordinate Analysis (PCoA) diagram with Bray distance. A P -value ≤ 0.05 was considered statistically significant. Missing values are due to errors in manipulation or missing samples during experimental protocols.

Results

Animals, timepoints, disease evolution, life span, body weight and adipose tissue distribution

In this study, a total of 40 mice were used. Of those, one mouse died shortly after the injection with ALL blasts, and one passed away after the OGTT procedure. Consequently, the study analysis incorporated data from 38 animals. The cohort characteristics of the animals are presented in Table 1. The xenogeneic model proved successful in developing ALL and responding to methotrexate treatment. Notably, there was no significant difference in the time-to-leukemia between non-treated and treated mice, with a mean of 52 days to leukemic cell detection in blood (time-to-leukemia timepoint). Non-treated mice exhibited a shorter lifespan compared to both control and treated groups. Supplementary Figure 1 depicts the [CD45 human/CD45 total]% distribution of mice across their respective experimental groups. As expected, control mice, injected with PBS only, did not develop leukemia. In contrast, the [CD45 human/CD45 total]% in non-treated mice was consistently increased throughout the experiment. Among the treated mice, 14 mice had detectable leukemic cell in circulation (leukemic cells > 5%), and methotrexate treatment commenced at day 49 after the ALL blasts engraftment. For the two mice in this group, treatment initiation occurred at days 63 and 77 post-grafting. Although methotrexate treatment successfully reduced the [CD45 human/CD45 total]%

below the 20% threshold, the ratio increased again after a 4-week remission ($29.3\% \pm 3.9$ at sacrifice) (Table 1). Mean body weight and adipose tissue was not significantly different between groups at any time point. It is noteworthy that intra-sex analysis did not reveal any differences in mean body weight or adipose tissue between groups (Supplementary Table 2).

Metabolic parameters at the time-to-leukemia

Glycemia and blood lipids were assessed at the time-to-leukemia to evaluate the impact of the disease itself. Interestingly, there was no significant difference in mean blood glucose levels between mice grafted with cALL blasts (leukemic cells >5%) and control mice (Figure 2A). Additionally, mean TG and mean HDL-c levels did not exhibit differences between the two groups (Figures 2B-C). However, TC levels were notably higher in female mice grafted with ALL blasts compared to controls (1.98 mmol/L vs 1.83 mmol/L, $p=0.05$) (Figure 2D).

Acute impact of treatment on metabolic parameters

During the acute phase after treatment, mean glucose levels were higher in female mice treated with methotrexate than controls (6.91 mmol/L vs 3.97 mmol/L, $p=0.025$) (Figure 2E). However, no differences were observed between control and treated mice for any lipid measured parameters (Supplementary Figures 2A to C).

Long-term impact of ALL and treatment

OGTT

The data related to mean blood glucose during the OGTT is presented in Figure 3A. After 120 minutes, the mean blood glucose was notably higher in the treated group compared

to the non-treated group (8.6 mmol/L vs 6.7 mmol/L, $p=0.003$) (Figure 3A). Upon stratifying the analysis by sex, this difference was evident only in females (7.6 mmol/L vs 5.1 mmol/L, $p=0.008$) (Supplementary Figure 3A). Accordingly, the area under the curve (AUC) of glycemic evolution during the OGTT was higher in treated female mice compared to non-treated female mice (1007 units of AUC vs 799 units of AUC, $p=0.01$) (Figure 3A).

Metabolic parameters at sacrifice

At sacrifice, there was no difference in mean glycemia between controls, non-treated and treated groups (data not shown). However, the mean HDL-c level was higher in treated mice compared to non-treated (0.46 mmol/L vs 0.38 mmol/L, $p=0.001$, Figure 3B). Intra-sex analysis shown in Figure 3B, a significant difference was observed only in females with higher concentration of HDL-c found in treated mice (0.42 mmol/L) compared to controls (0.25 mmol, $p=0.018$) and non-treated (0.25 mmol, $p=0.003$). No significant differences between groups were noted in plasma TC (Figure 3C) and TG (Supplementary Figure 3B). The assessment of lipids in two organs central to lipid metabolism revealed that liver TC concentration (Figure 3D) significantly differed based on the mouse sex group, with higher content found in female non-treated ALL-grafted (1.93 mg/g of liver, $p=0.008$) and treated mice (1.78 mg/g of liver, $p=0.024$) compared to female controls (1.21 mg/g of liver). Conversely, TC concentration in the jejunum tended to be lower in female treated mice than in the two other groups (treated: 0.47 mg/g of jejunum vs. controls: 0.69 mg and non-treated: 0.68 mg, $p=0.073$ and $p=0.083$, respectively, Figure 3E). No significant differences between groups were found in TG content of jejunum or liver (data not shown).

Expression of hepatic proteins involved in energy, glucose, and lipid metabolism

The comparison of protein expression of P-AMPK α and AMPK α , key hepatic regulators of glucose and lipid metabolism, did not reveal statistically significant differences

(Supplementary Figures 4A and B). However, the P-AMPK α /AMPK α ratio was significantly higher in non-treated ALL-grafted mice in comparison to controls ($195 \pm 13\%$ of controls, $p=0.01$, Figure 4A). The expression of P38-MAPK (Supplementary Figures 5A, B and C) and AKT (Supplementary Figures 6A, B and C), involved in insulin-signaling pathways, were also compared and no differences in expression were found between groups. The comparison of protein expression of ACC and P-ACC did not differ between groups (Supplementary Figures 7A and B), but a tendency for a lower P-ACC/ACC total ratio was observed in ALL mice that were not treated compared to controls (non-treated: $69 \pm 13\%$ and treated: $93 \pm 12\%$ of controls, $p=0.56$, Figure 4B). Similarly, protein expression of FAS was lower in ALL-grafted mice compared to controls, with the difference reaching statistical significance in the non-treated mouse group ($66 \pm 13\%$ of controls, $p=0.014$, Figure 4C). There was a similar tendency for CPT1A ($71 \pm 15\%$ of controls, $p=0.126$, Supplementary Figure 7C). Intra-sex analysis did not reveal differences for P-ACC/ACC total ratio, FAS and CPT1A protein expression.

Gut microbiota

The longitudinal analysis of the gut microbiota of the treated group showed no differences in α -diversity (Chao1 and Shannon indexes) (data not shown) or relative abundance (i.e. Firmicutes/Bacteroidetes ratio) among timepoints even when sexes were analyzed separately (data not shown). Further analysis revealed that, in the acute phase after the treatment, treated male mice displayed a higher relative abundance of S24_7 family compared to T0 (24% vs. 8%, $p=0.046$, Figure 5A), levels that tended to remain slightly elevated at sacrifice (14%, $p=0.87$ vs. T0). No longitudinal difference was found in relative abundance at the class, order, and genus levels (data not shown). Nonetheless, as shown in Figure 5B, treatment induced a clear shift in the β -diversity of bacterial communities in female treated mice (acute phase after the treatment vs. T0, $p=0.048$), a tendency that remained in the long-term (sacrifice vs. T0, $p=0.076$). A similar shift was not observed in males. At sacrifice, there was no significant difference was found for both

Chao1 and Shannon indexes between groups (data not shown). The relative abundance of the main phylum (Bacteroidetes, Firmicutes, Tenericutes, other) at sacrifice is shown in Figure 6A. Although no difference reached statistical significance, there was a tendency for treated mice to have a higher percentage of Bacteroidetes (treated: 29%, non-treated: 16% and controls: 14%, $p=0.165$) and lower relative abundance of Firmicutes (treated: 67%, non-treated: 81% and controls: 86%, $p=0.093$). The same pattern was found when data were stratified by sex. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio was different between groups, with a lower ratio found in ALL-treated mice compared to controls (2.3 vs. 4.8, $p=0.043$, Supplementary Figure 8A). Although no significant difference between groups was observed related to class, order and genus, there was a tendency, in treated mice, for a higher relative abundance of Rikenellaceae family compared to the other groups (Supplementary Figure 8B). The comparison of β -diversity at sacrifice suggests, in females, an impact of disease, although not reaching statistical significance (vs. controls, $p=0.086$, Figure 6B).

Fecal short-chain fatty acids

In ALL-grafted and treated mice, compared to T0, total SCFA content was considerably reduced in the acute phase after the treatment, and these lower levels were maintained over time, i.e. at sacrifice (Figure 7A). Analyzing SCFA separately showed the same pattern for acetate, propionate, lactate and caproate levels (Figures 7 B to E). Intra-sex analysis revealed that the reduction of fecal SCFA content by methotrexate treatment throughout the experiment was statistically significant only in female mice for acetate, lactate and caproate (Figure 7 B-D-E). No difference between timepoints were found for butyric acid (Figure 7F) nor for isobutyric, valeric, isovaleric, and succinic acids (data not shown). Furthermore, comparison of SCFA between the 3 experimental groups at sacrifice highlighted differences in male (total SCFA, acetate, propionate, isovalerate and isobutyrate) and female (propionate, butyrate and isovalerate) mice. As shown in Figure 8, we found that male mice that were grafted with ALL had a higher concentration of total

SCFA compared to controls, specifically of acetate, propionate isovalerate and isobutyrate. Conversely, in females, most SCFA were lower in ALL-grafted mice than in controls, a reduction that was statistically significant in the treated mice group (propionate and isovalerate). No differences between groups nor sexes were found for lactic, succinic and caproic acids (data not shown).

4. Discussion.

Main findings

In this study, we observed that the disease itself increased blood and liver TC levels. Methotrexate treatment had an impact on HDL-c levels in blood but also caused dysglycemia, especially in female mice. Changes in key metabolic liver proteins, along with shifts in gut microbiota composition, diversity, and metabolites, could potentially explain the heightened susceptibility of ALL-grafted female mice to develop metabolic complications.

Feasibility of the NSG model

To the best of our knowledge, no other study has delved into the impact of cancer itself or its combination with a specific treatment on metabolic parameters using a patient-derived xenograft mouse model. Typically, these models have been used to evaluate the effectiveness of novel therapeutic agents on tumor growth [64-67]. Various mouse strains genetically modified to suppress the immune system are available, each with its own set of advantages and disadvantages. In a comprehensive review comparing different strains, it was concluded that the NSG mouse model has a better engraftment efficiency for human cells and tissues, along with and a longer life span compared to other immunodeficient models, enabling the assessment of the long-term impact of treatment [68]. Also, patient-derived xenograft (PDX) mice models have been shown to reflect the biological properties of their respective donor leukemia [69, 70]. In our study, we successfully engrafted NSG mice with cALL blasts and induced a decrease in blast

percentage among circulating CD45+ cells through methotrexate treatment. Moreover, mice genetically modified to suppress their immune system are not ideal models to study metabolic complications as they are particularly resistant to developing dysglycemia and accumulating fat when challenged with a high-fat diet [71, 72]. Nevertheless, they remain are still capable, to a certain extent, of gaining weight and accumulating fat [72]. Given its ability to develop the disease, undergo treatments to control leukemia, and gain some fat, this model was believed to be the most realistic representation of a patient diagnosed with ALL and was chosen for the present study.

Metabolic outcomes associated with leukemia development.

In our study, we observed that the growth of the leukemic cells in the mice impacts blood TC levels, mainly in female mice. These findings are consistent with lipid perturbations noted at the diagnosis of ALL in both children and adults. Two studies, including 112 and 64 ALL children, reported that compared to respective national references (i.e., sex and age-matched healthy population) 98% and 92% had low HDL-c levels, 1% and 67% had high LDL-c levels, 5% and 41% had hypercholesterolemia and, 58% and 83% had hypertriglyceridemia at diagnosis, respectively [35, 73]. In adults, leukemic patients at diagnosis exhibit higher triglyceridemia and very low-density lipoproteins (VLDL) level in plasma, and lower HDL-c concentration than healthy controls [74]. Intra-sex analysis was not performed in the pediatric studies [35, 73], but in adults, further analysis revealed that mean plasma levels of TG and VLDL-c were significantly elevated only in women with leukemia in compared to healthy peers [74]. Moreover, altered glucose metabolism have been described in a cohort of leukemic children, as the proportion of patients with hyperglycemia (>7.77 mmol/L) at diagnosis was 6% [37], which was not reflected in our study. The fact that NSG mice have a different lipid metabolism than humans (i.e. absence of cholesteryl ester transfer protein (CETP) and HDL as primary cholesterol transporter [75] and that they are very resistant to metabolic stress, especially regarding glucose metabolism [72], could explain the variability in dyslipidemia development and lack of effect on glycemic parameters related to the disease in our study.

Metabolic complications related to methotrexate treatment

In our study, methotrexate treatment worsens disruptions in lipid metabolism and induces glucose alterations. Compared to female controls, female mice treated with methotrexate had higher fasting glucose in the acute phase after treatment, and they exhibited glucose intolerance in the long-term phase after treatment, assessed by the OGTT, along with higher mean plasma HDL-c at sacrifice. Similar perturbations in glucose and blood lipid concentrations have been described in patients exposed to ALL treatment. When blood parameters are assessed a few years after the end of treatment (between 3 to 5 years post-treatment), studies have reported that some patients treated for cALL display elevated fasting glycemia (4-15%) [76-78], glucose intolerance (8%) [79] and insulin resistance (30-35%) [76, 78, 79]. A high prevalence of blood lipid abnormalities such as hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia and low HDL-c was also observed in childhood cancer patients during treatment [80], and in the short-term after the end of therapy (i.e.: 2 weeks to 5 years) [73, 77, 78], and even decades later [13, 81]. In the short-term after cALL treatment, some factors have been related to glucose and lipid perturbations such as sex and treatment exposure. Studies have shown that total body irradiation and cranial radiotherapy exposure have been linked to an increased risk of dyslipidemia, such as hypertriglyceridemia, in childhood cancer survivors [82, 83]. Moreover, in line with our findings, compared to males, a higher proportion of females develop glucose metabolism perturbations (hyperglycemia requiring insulin) during cALL treatment [84] and dyslipidemia at survivorship [18]. Among the drugs used to treat cALL, methotrexate does not appear to be the drug that has the most impact on glucose metabolism. Hence, the administration of asparaginase [85] and corticosteroids [86] as part of cALL treatment protocol has been associated with the elevation of glycemia in patients. Surprisingly, an impact was detected in the framework of our studies related to methotrexate treatment. Further studies are needed to corroborate these findings.

Lipid concentrations and key proteins of the glucose and lipid metabolism in the liver

The use of an animal model allows us to delve into the mechanisms behind these poorly understood alterations. In female mice, the disease, combined or not with methotrexate treatment, caused, a greater accumulation of TC in the liver in the long-term, but not of TG. Concurrently, examining AMPK α protein expression revealed a higher P-AMPK α /AMPK α ratio (i.e. indicating protein activity) in these groups, but it was only significantly different from controls in the non-treated group. AMPK α plays a crucial role in cell energy regulation, as its activation (phosphorylation) down-regulates glucose and lipid synthesis, while up-regulating lipid oxidation [87]. Activation of hepatic AMPK inhibits lipogenesis by inactivating ACC through phosphorylation, thus preventing the enzyme from converting acetyl CoA into malonyl CoA, a precursory step of fatty acid synthesis. Through this mechanism, AMPK reduces *de novo* lipogenesis and stimulates β -oxidation [88-90]. Although we did not find significant differences in the expression of ACC between groups, non-treated ALL-graft mice, compared to controls, had a significantly lower expression of FAS, another protein crucial for lipogenesis and fatty acid oxidation. Reduced expression of FAS, which occurs during fasting leads to hepatic fatty acid catabolism by increasing mitochondrial β -oxidation through activation of the transcription factor peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) [91]. Therefore, the modulation of AMPK α activity and FAS expression could be factors, if not the only ones, triggering catabolic pathways to restore energy balance in ALL-graft mice (treated or not), resulting in the absence of differences in hepatic and TG amounts of TG compared to controls. Those findings do not align with the hypertriglyceridemia observed in survivors of cALL patients, which has been associated with long-term sequelae exposure to cranial radiotherapy [82]. On the other hand, lower CPT1A expression in our study suggests less β -oxidation [92] in ALL-grafted mice, indicating a deregulation of fatty acid catabolism. This could contribute to the lipid perturbation observed in cALL survivors, such as elevated TG [18], but as a limited measurable consequence in our mouse model. To have a better understanding of this mechanism, mitochondrial ADP/ATP ratio, H₂O₂ and 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1), oxidized palmitate with the use of

radioactivity, peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1-alpha (PGC-1 α) and other key proteins involved in β -oxidation (CACT, VLCAD, LCHAD, MCAD, SCAD, ACADL) in liver homogenates [93, 94], could be measured. In summary, our data suggest that cALL can cause dysregulation of key hepatic proteins in lipid metabolism without significant effect on TG levels in plasma and liver, but with an impact on hepatic TC concentrations.

Methotrexate effect on gut microbiota

One possible mechanism behind the development of cardiometabolic complications after cALL is through the gut microbiota. In our study, we noted a shift of β -diversity in female mice after treatment compared to baseline, indicating a sex-dependent impact of treatment. Meanwhile, in male mice, the relative abundance of the S24_7 bacteria family was higher after methotrexate treatment compared to baseline. S24_7 is a family of bacteria that belongs to Bacteroidetes phyla. In an animal study, the relative abundance of S24_7 family was positively associated with active mice and negatively associated with a high-fat diet and a sedentary lifestyle [95].

At sacrifice, the comparison of the 3 experimental groups showed a significant difference in Firmicutes/Bacteroidetes ratio, which was lower in treated mice compared to controls. However, interpreting the impact of this altered ratio on cardiometabolic health should be done with caution due to its discrepancy. A recent systematic review demonstrated varied findings in Firmicutes/Bacteroidetes ratios in subjects with obesity and metabolic disorders, with some studies reporting an increase, some a decrease, and others no change compared to a control group [96]. Nevertheless, a reduction in this ratio is believed to indicate dysbiosis leading to adverse consequences for the host [97]. Lowering Firmicutes can result in a lower abundance of commensal Gram-positive bacteria producing SCFA, especially butyrate [98-100]. On the other hand, increasing Bacteroidetes may lead to higher abundance of Gram-negative bacteria that possess LPS on their external membrane, responsible for chronic low-grade inflammation in systemic

circulation [101]. As found in our study, this bacterial profile resulting from ALL disease and methotrexate treatment has been associated with lower production of SCFA, significantly altered in female mice, as portrayed by the reduced SCFA content in feces at sacrifice compared to baseline. Moreover, fecal SCFA content was considerably affected by the disease itself and, in a greater manner, by methotrexate persisting in the long-term. Altogether, these results suggest that in females, gut microbiota alterations and lower SCFA production are linked with detrimental metabolic outcomes, while in males, having a favorable bacterial profile and higher SCFA content suggests a protective effect for treated ALL-graft mice. This is in line with previous study as acetate, propionate, and butyrate, the most predominant SCFA produced by the gut microbiota, play a crucial role in gut and metabolic health [102]. SCFA are used by colonocytes as a source of energy, help maintain the integrity of the intestinal barrier, and have anti-inflammatory and antioxidant properties [103]. A lower production or content of SCFA can lead to greater intestinal permeability, promoting the passage of endotoxins, such as LPS, into the systemic circulation, inducing a state of metabolic endotoxemia associated with glucose and lipid metabolism disorders [45, 104]. Recent studies have demonstrated differences in the diversity and composition of the gut microbiota in cALL patients at diagnosis [105, 106], during treatment [107] and after treatment [108] compared to healthy individuals. Specifically, methotrexate had a negative impact on the abundance and composition of gut microbiota in rats [47]. In cALL patients, 3 days of high-dose methotrexate led to a decrease in the abundance of *Bifidobacteria*, *Lactobacillus*, and *Escherichia coli* that remained below the baseline levels after 7 days of treatment [109]. Therefore, our results support the need to closely examine the role of intestinal microbiota modulation and its metabolite production in the genesis of cardiometabolic complications affecting cALL survivors.

A strength of our study lies in the patient-derived xenogeneic mouse model's capacity to establish a cause-effect relationship between leukemia, methotrexate and glucose and lipid metabolism. The uniqueness of our study design allows the assessment of the acute

and long-term effects of disease and treatment. Additionally, the inclusion of both males and females enables the evaluation of sex-dependent consequences of the disease and treatment. However, the study limitations, including the recrudescence of the disease 4 weeks after remission, which could have impacted the ability to discriminate between the effects caused by disease and treatment. Furthermore, the lack of a control group receiving only methotrexate treatment and of a group that received multiple agents like in cALL treatment could limit further comparisons. Also, we could not find a clear effect of the disease and the treatment on liver β -oxidation. Further analysis on fatty acids levels and key protein of β -oxidation pathways could be useful to clarify this link. Finally, only one blast strain from an individual was used in our study and therefore, do not represent all types of cALL. However, the strain that was chosen belonged to the most common form of cALL.

5. Conclusion.

This research significantly enhances our understanding of how leukemia and methotrexate influence glucose and lipid metabolism, intricately linked with dysbiosis and SCFA production. Notably, our findings underscore substantial sex-related differences, highlighting the heightened vulnerability of female mice to both the disease and treatment when compared to male counterparts. These outcomes strongly advocate for a more in-depth exploration into the origins of treatment-induced dysbiosis and the intricate cellular mechanisms that contribute to the development of metabolic complications throughout and beyond the course of cALL.

List of abbreviation

cALL: Childhood acute lymphoblastic leukemia

DHFR: Dihydrofolate reductase

LDL-C: Low-density lipoprotein-cholesterol

HDL-C: Low-density lipoprotein-cholesterol

SCFA: Short-chain fatty acids

NSG: NOD/Shi-scid (SCID)/interleukin-2 receptor γ (Il2rg) null

NK: Natural killer

SJUHC: Sainte-Justine University Hospital Center

OGTT: Oral glucose tolerance test

TG: Triglycerides

TC: total cholesterol

PEG: Polyethyleneglycol

OTUs: Operational Taxonomic Units

QIIME: Quantitative Insights Into Microbial Ecology

LC-MS/MS: Liquid chromatography with tandem mass spectrometry

AMPK α : AMP-activated protein kinase α

P-AMPK α : Phosphorylated AMPK α Thr172

FAS: Fatty acid synthase

CPT1A: Carnitine palmitoyl transferase 1 isoform A

ACC: Acetyl-CoA carboxylase

P-ACC: Phospho-Acetyl-CoA Carboxylase (Ser79)

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

ANOVA: Analysis of variance

PERMANOVA: Permutational ANOVA

PCoA: Principal Coordinate Analysis

VLDL: very low-density lipoprotein

CETP: Cholesteryl ester transfer protein

PPAR α : Peroxisome proliferator-activated receptor α

References.

1. Centre for Surveillance and Applied Research, P.H.A.o.C., *Cancer in Young People in Canada Data Tool. 2020 Edition. Public Health Infobase*. Ottawa (ON): Public Health Agency of Canada, 2022.
2. Hutter, J.J., *Childhood leukemia*. *Pediatr Rev*, 2010. **31**(6): p. 234-41.
3. Malard, F. and M. Mohty, *Acute lymphoblastic leukaemia*. *Lancet*, 2020. **395**(10230): p. 1146-1162.
4. Hunger, S.P., et al., *Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: acute lymphoblastic leukemia*. *Pediatr Blood Cancer*, 2013. **60**(6): p. 957-63.
5. Ramsey, L.B., et al., *Consensus Guideline for Use of Glucarpidase in Patients with High-Dose Methotrexate Induced Acute Kidney Injury and Delayed Methotrexate Clearance*. *Oncologist*, 2018. **23**(1): p. 52-61.
6. Lansiaux, A., [Antimetabolites]. *Bull Cancer*, 2011. **98**(11): p. 1263-74.
7. Luengo, A., D.Y. Gui, and M.G. Vander Heiden, *Targeting Metabolism for Cancer Therapy*. *Cell Chem Biol*, 2017. **24**(9): p. 1161-1180.
8. Pui, C.H., et al., *Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation*. *N Engl J Med*, 2009. **360**(26): p. 2730-41.
9. Trimis, G., et al., *Early indicators of dysmetabolic syndrome in young survivors of acute lymphoblastic leukemia in childhood as a target for preventing disease*. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2007. **29**(5): p. 309-14.
10. Meacham, L.R., et al., *Cardiovascular risk factors in adult survivors of pediatric cancer--a report from the childhood cancer survivor study*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010. **19**(1): p. 170-81.
11. Mulrooney, D.A., et al., *Cardiac outcomes in a cohort of adult survivors of childhood and adolescent cancer: retrospective analysis of the Childhood Cancer Survivor Study cohort*. *Bmj*, 2009. **339**: p. b4606.
12. Baker, K.S., et al., *Impact of treatment exposures on cardiovascular risk and insulin resistance in childhood cancer survivors*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2013. **22**(11): p. 1954-63.
13. Levy, E., et al., *Cardiometabolic Risk Factors in Childhood, Adolescent and Young Adult Survivors of Acute Lymphoblastic Leukemia - A Petale Cohort*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 17684.
14. Nottage, K.A., et al., *Metabolic syndrome and cardiovascular risk among long-term survivors of acute lymphoblastic leukaemia - From the St. Jude Lifetime Cohort*. *Br J Haematol*, 2014.
15. Oeffinger, K.C., *Are survivors of acute lymphoblastic leukemia (ALL) at increased risk of cardiovascular disease?* *Pediatr Blood Cancer*, 2008. **50**(2 Suppl): p. 462-7; discussion 468.
16. Nottage, K.A., et al., *Metabolic syndrome and cardiovascular risk among long-term survivors of acute lymphoblastic leukaemia - From the St. Jude Lifetime Cohort*. *Br J Haematol*, 2014. **165**(3): p. 364-74.

17. Ociepa, T., et al., *Prevalence and Risk Factors for Arterial Hypertension Development in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Survivors*. J Pediatr Hematol Oncol, 2019. **41**(3): p. 175-180.
18. Morel, S., et al., *Lipid and lipoprotein abnormalities in acute lymphoblastic leukemia survivors*. J Lipid Res, 2017. **58**(5): p. 982-993.
19. Armstrong, G.T., et al., *Long-term health status among survivors of childhood cancer: does sex matter?* J Clin Oncol, 2007. **25**(28): p. 4477-89.
20. Muhammad, S.A., et al., *Cisplatin's potential for type 2 diabetes repositioning by inhibiting CDKN1A, FAS, and SESN1*. Comput Biol Med, 2021. **135**: p. 104640.
21. Cremer, P., et al., *The effect of L-asparaginase on lipid metabolism during induction chemotherapy of childhood lymphoblastic leukaemia*. Eur J Pediatr, 1988. **147**(1): p. 64-7.
22. Dacou-Voutetakis, C., et al., *Abnormal glucose tolerance in children with acute leukemia. Effect of induction chemotherapy including L-asparaginase*. Am J Pediatr Hematol Oncol, 1983. **5**(2): p. 139-46.
23. Grimes, A., et al., *Hyperglycemia During Childhood Cancer Therapy: Incidence, Implications, and Impact on Outcomes*. JNCI Monographs, 2019. **2019**(54): p. 132-138.
24. Pui, C.-H., et al., *Risk factors for hyperglycemia in children with leukemia receiving L-asparaginase and prednisone*. The Journal of pediatrics, 1981. **99**(1): p. 46-50.
25. Ortega, J.A., et al., *L-Asparaginase, vincristine, and prednisone for induction of first remission in acute lymphocytic leukemia*. Cancer research, 1977. **37**(2): p. 535-540.
26. Bakk, I., et al., *Steroid-induced hypertension during induction chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia in us children's hospitals*. Journal of pediatric hematology/oncology, 2018. **40**(1): p. 27-30.
27. Tong, W.H., et al., *The toxicity of very prolonged courses of PEGasparaginase or Erwinia asparaginase in relation to asparaginase activity, with a special focus on dyslipidemia*. Haematologica, 2014. **99**(11): p. 1716-21.
28. Halton, J.M., et al., *Blood lipid profiles in children with acute lymphoblastic leukemia*. Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society, 1998. **83**(2): p. 379-384.
29. Garófolo, A. and P.J.R.B.d.C. dos Santos Maia-Lemos, *Low Levels of High-density Lipoprotein in Patients with Pediatric Cancer at Diagnosis*. 2019. **65**(3).
30. Moschovi, M., et al., *Serum lipid alterations in acute lymphoblastic leukemia of childhood*. Journal of pediatric hematology/oncology, 2004. **26**(5): p. 289-293.
31. Bhojwani, D., et al., *Severe hypertriglyceridaemia during therapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia*. European journal of cancer, 2014. **50**(15): p. 2685-2694.
32. Roxburgh, C.S. and D.C. McMillan, *Cancer and systemic inflammation: treat the tumour and treat the host*. Br J Cancer, 2014. **110**(6): p. 1409-12.
33. Battisti, V., et al., *Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients*. Clin Biochem, 2008. **41**(7-8): p. 511-8.

34. Louis, C.U. and L. Butani, *High blood pressure and hypertension in children with newly diagnosed acute leukemia and lymphoma*. *Pediatr Nephrol*, 2008. **23**(4): p. 603-9.
35. Mogensen, P.R., et al., *Dyslipidemia at diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia*. *PLoS One*, 2020. **15**(4): p. e0231209.
36. Esbenshade, A.J., et al., *Obesity and insulin resistance in pediatric acute lymphoblastic leukemia worsens during maintenance therapy*. *Pediatr Blood Cancer*, 2013. **60**(8): p. 1287-91.
37. Demedis, J., et al., *Hyperglycemia and Other Glycemic Measures Throughout Therapy for Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia and Lymphoma*. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2023. **45**(2): p. e154-e160.
38. Federici, M., *Gut microbiome and microbial metabolites: a new system affecting metabolic disorders*. *J Endocrinol Invest*, 2019. **42**(9): p. 1011-1018.
39. Scheithauer, T.P.M., et al., *Gut Microbiota as a Trigger for Metabolic Inflammation in Obesity and Type 2 Diabetes*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 571731.
40. Cox, A.J., N.P. West, and A.W. Cripps, *Obesity, inflammation, and the gut microbiota*. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2015. **3**(3): p. 207-15.
41. Di Tommaso, N., A. Gasbarrini, and F.R. Ponziani, *Intestinal Barrier in Human Health and Disease*. *Int J Environ Res Public Health*, 2021. **18**(23).
42. Fitzgerald, K.A. and J.C. Kagan, *Toll-like Receptors and the Control of Immunity*. *Cell*, 2020. **180**(6): p. 1044-1066.
43. Potrykus, M., et al., *Intestinal Microbiota as a Contributor to Chronic Inflammation and Its Potential Modifications*. *Nutrients*, 2021. **13**(11).
44. Morrison, D.J. and T. Preston, *Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism*. *Gut Microbes*, 2016. **7**(3): p. 189-200.
45. Guo, Z., et al., *Metabolites of Gut Microbiota and Possible Implication in Development of Diabetes Mellitus*. *J Agric Food Chem*, 2022. **70**(20): p. 5945-5960.
46. Beutheu Youmba, S., et al., *Methotrexate modulates tight junctions through NF- κ B, MEK, and JNK pathways*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2012. **54**(4): p. 463-70.
47. Fijlstra, M., et al., *Substantial decreases in the number and diversity of microbiota during chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis in a rat model*. *Support Care Cancer*, 2015. **23**(6): p. 1513-22.
48. Kanaji, N., et al., *Higher susceptibility of NOD/LtSz-scid Il2rg (-/-) NSG mice to xenotransplanted lung cancer cell lines*. *Cancer Manag Res*, 2014. **6**: p. 431-6.
49. Wege, A.K., et al., *Humanized tumor mice--a new model to study and manipulate the immune response in advanced cancer therapy*. *Int J Cancer*, 2011. **129**(9): p. 2194-206.
50. Machida, K., et al., *Higher susceptibility of NOG mice to xenotransplanted tumors*. *J Toxicol Sci*, 2009. **34**(1): p. 123-7.
51. Carreno, B.M., et al., *Immunodeficient mouse strains display marked variability in growth of human melanoma lung metastases*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(10): p. 3277-86.

52. Ito, M., et al., *NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells*. *Blood*, 2002. **100**(9): p. 3175-82.
53. Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley, *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. *J Biol Chem*, 1957. **226**(1): p. 497-509.
54. Vikari, J., *Precipitation of plasma lipoproteins by PEG-6000 and its evaluation with electrophoresis and ultracentrifugation*. *Scand J Clin Lab Invest*, 1976. **36**(3): p. 265-8.
55. Auclair, N., et al., *Sar1b mutant mice recapitulate gastrointestinal abnormalities associated with chylomicron retention disease*. *J Lipid Res*, 2021. **62**: p. 100085.
56. Auclair, N., et al., *High-fat diet reveals the impact of Sar1b defects on lipid and lipoprotein profile and cholesterol metabolism*. *J Lipid Res*, 2023. **64**(9): p. 100423.
57. Caron, A.Z., et al., *The SIRT1 deacetylase protects mice against the symptoms of metabolic syndrome*. *Faseb j*, 2014. **28**(3): p. 1306-16.
58. Arthur, J.C., et al., *Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota*. *Science*, 2012. **338**(6103): p. 120-3.
59. Abujamel, T., et al., *Defining the vulnerable period for re-establishment of Clostridium difficile colonization after treatment of C. difficile infection with oral vancomycin or metronidazole*. *PLoS One*, 2013. **8**(10): p. e76269.
60. Pound, L.D., et al., *Cathelicidin Antimicrobial Peptide: A Novel Regulator of Islet Function, Islet Regeneration, and Selected Gut Bacteria*. *Diabetes*, 2015. **64**(12): p. 4135-47.
61. Han, J., et al., *An isotope-labeled chemical derivatization method for the quantitation of short-chain fatty acids in human feces by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Anal Chim Acta*, 2015. **854**: p. 86-94.
62. Janes, K.A., *An analysis of critical factors for quantitative immunoblotting*. *Sci Signal*, 2015. **8**(371): p. rs2.
63. Dhariwal, A., et al., *MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data*. *Nucleic Acids Res*, 2017. **45**(W1): p. W180-w188.
64. Zhang, H., et al., *Proteus mirabilis inhibits cancer growth and pulmonary metastasis in a mouse breast cancer model*. *PLoS One*, 2017. **12**(12): p. e0188960.
65. Schlachterman, A., et al., *Combined resveratrol, quercetin, and catechin treatment reduces breast tumor growth in a nude mouse model*. *Transl Oncol*, 2008. **1**(1): p. 19-27.
66. Dadachova, E., et al., *Treatment with rhenium-188-perrhenate and iodine-131 of NIS-expressing mammary cancer in a mouse model remarkably inhibited tumor growth*. *Nucl Med Biol*, 2005. **32**(7): p. 695-700.
67. Ojo-Amaize, E.A., et al., *Hypoestoxide inhibits tumor growth in the mouse CT26 colon tumor model*. *World J Gastroenterol*, 2007. **13**(34): p. 4586-8.
68. Zhou, Q., et al., *Humanized NOD-SCID IL2rg^{-/-} mice as a preclinical model for cancer research and its potential use for individualized cancer therapies*. *Cancer Lett*, 2014. **344**(1): p. 13-19.

69. Morisot, S., et al., *High frequencies of leukemia stem cells in poor-outcome childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias*. *Leukemia*, 2010. **24**(11): p. 1859-66.
70. Schmitz, M., et al., *Xenografts of highly resistant leukemia recapitulate the clonal composition of the leukemogenic compartment*. *Blood*, 2011. **118**(7): p. 1854-64.
71. Friedline, R.H., et al., *Genetic ablation of lymphocytes and cytokine signaling in nonobese diabetic mice prevents diet-induced obesity and insulin resistance*. *Faseb j*, 2016. **30**(3): p. 1328-38.
72. Behan, J.W., et al., *Activation of adipose tissue macrophages in obese mice does not require lymphocytes*. *Obesity (Silver Spring)*, 2013. **21**(7): p. 1380-8.
73. Moschovi, M., et al., *Serum lipid alterations in acute lymphoblastic leukemia of childhood*. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2004. **26**(5): p. 289-93.
74. Usman, H., et al., *Revisiting the dyslipidemia associated with acute leukemia*. *Clin Chim Acta*, 2015. **444**: p. 43-9.
75. Gordon, S.M., et al., *A comparison of the mouse and human lipoproteome: suitability of the mouse model for studies of human lipoproteins*. *J Proteome Res*, 2015. **14**(6): p. 2686-95.
76. Lowas, S.R., D. Marks, and S. Malempati, *Prevalence of transient hyperglycemia during induction chemotherapy for pediatric acute lymphoblastic leukemia*. *Pediatr Blood Cancer*, 2009. **52**(7): p. 814-8.
77. Barbosa-Cortés, L., et al., *Adipokines, insulin resistance, and adiposity as a predictors of metabolic syndrome in child survivors of lymphoma and acute lymphoblastic leukemia of a developing country*. *BMC Cancer*, 2017. **17**(1): p. 125.
78. Kartal, İ., et al., *Frequency of obesity and metabolic syndrome in childhood leukemia and lymphoma survivors*. *Diabetol Metab Syndr*, 2022. **14**(1): p. 16.
79. Surapolchai, P., et al., *Impaired glucose tolerance and insulin resistance in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia: prevalence and risk factors*. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2010. **32**(5): p. 383-9.
80. Bhojwani, D., et al., *Severe hypertriglyceridaemia during therapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia*. *Eur J Cancer*, 2014. **50**(15): p. 2685-94.
81. Azanan, M.S., et al., *Immunity in young adult survivors of childhood leukemia is similar to the elderly rather than age-matched controls: Role of cytomegalovirus*. *Eur J Immunol*, 2016. **46**(7): p. 1715-26.
82. Oeffinger, K.C., et al., *Cardiovascular risk factors in young adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia*. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2001. **23**(7): p. 424-30.
83. Goldberg, J.F., et al., *Dyslipidemia and Cardiovascular Disease Among Childhood Cancer Survivors: A St. Jude Lifetime Cohort Report*. *J Natl Cancer Inst*, 2023.
84. McCormick, M.C., et al., *Hyperglycemia requiring insulin during acute lymphoblastic leukemia induction chemotherapy is associated with increased adverse outcomes and healthcare costs*. *Pediatr Blood Cancer*, 2020. **67**(9): p. e28475.

85. Pollock, N.I., et al., *Hyperglycemia during induction therapy for acute lymphoblastic leukemia is temporally linked to pegaspargase administration*. *Pediatr Blood Cancer*, 2022. **69**(7): p. e29505.
86. Warris, L.T., et al., *Acute Activation of Metabolic Syndrome Components in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Treated with Dexamethasone*. *PLoS One*, 2016. **11**(6): p. e0158225.
87. Long, Y.C. and J.R. Zierath, *AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(7): p. 1776-83.
88. Foretz, M., et al., *[Regulation of energy metabolism by AMPK: a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic and cardiovascular diseases]*. *Med Sci (Paris)*, 2006. **22**(4): p. 381-8.
89. Fang, C., et al., *The AMPK pathway in fatty liver disease*. *Front Physiol*, 2022. **13**: p. 970292.
90. Smith, B.K., et al., *Treatment of nonalcoholic fatty liver disease: role of AMPK*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2016. **311**(4): p. E730-e740.
91. Jensen-Urstad, A.P. and C.F. Semenkovich, *Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: housekeeper or messenger?* *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1821**(5): p. 747-53.
92. Schlaepfer, I.R. and M. Joshi, *CPT1A-mediated Fat Oxidation, Mechanisms, and Therapeutic Potential*. *Endocrinology*, 2020. **161**(2).
93. Houten, S.M. and R.J. Wanders, *A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation*. *J Inher Metab Dis*, 2010. **33**(5): p. 469-77.
94. Kleme, M.L., et al., *CFTR Deletion Confers Mitochondrial Dysfunction and Disrupts Lipid Homeostasis in Intestinal Epithelial Cells*. *Nutrients*, 2018. **10**(7).
95. Evans, C.C., et al., *Exercise prevents weight gain and alters the gut microbiota in a mouse model of high fat diet-induced obesity*. *PLoS One*, 2014. **9**(3): p. e92193.
96. Xu, Z., et al., *Gut microbiota in patients with obesity and metabolic disorders - a systematic review*. *Genes Nutr*, 2022. **17**(1): p. 2.
97. Stojanov, S., A. Berlec, and B. Štrukelj, *The Influence of Probiotics on the Firmicutes/Bacteroidetes Ratio in the Treatment of Obesity and Inflammatory Bowel disease*. *Microorganisms*, 2020. **8**(11).
98. Fusco, W., et al., *Short-Chain Fatty-Acid-Producing Bacteria: Key Components of the Human Gut Microbiota*. *Nutrients*, 2023. **15**(9).
99. Singh, V., et al., *Butyrate producers, "The Sentinel of Gut": Their intestinal significance with and beyond butyrate, and prospective use as microbial therapeutics*. *Front Microbiol*, 2022. **13**: p. 1103836.
100. Nogal, A., A.M. Valdes, and C. Menni, *The role of short-chain fatty acids in the interplay between gut microbiota and diet in cardio-metabolic health*. *Gut Microbes*, 2021. **13**(1): p. 1-24.
101. Gibiino, G., et al., *Exploring Bacteroidetes: Metabolic key points and immunological tricks of our gut commensals*. *Dig Liver Dis*, 2018. **50**(7): p. 635-639.
102. Blaak, E.E., et al., *Short chain fatty acids in human gut and metabolic health*. *Benef Microbes*, 2020. **11**(5): p. 411-455.

103. Portincasa, P., et al., *Gut Microbiota and Short Chain Fatty Acids: Implications in Glucose Homeostasis*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(3).
104. Saad, M.J., A. Santos, and P.O. Prada, *Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance*. Physiology (Bethesda), 2016. **31**(4): p. 283-93.
105. Bai, L., et al., *Changes in the gastrointestinal microbiota of children with acute lymphoblastic leukaemia and its association with antibiotics in the short term*. J Med Microbiol, 2017. **66**(9): p. 1297-1307.
106. Rajagopala, S.V., et al., *Gastrointestinal microbial populations can distinguish pediatric and adolescent Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) at the time of disease diagnosis*. BMC Genomics, 2016. **17**(1): p. 635.
107. Chua, L.L., et al., *Temporal changes in gut microbiota profile in children with acute lymphoblastic leukemia prior to commencement-, during-, and post-cessation of chemotherapy*. BMC Cancer, 2020. **20**(1): p. 151.
108. Chua, L.L., et al., *Reduced microbial diversity in adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia and microbial associations with increased immune activation*. Microbiome, 2017. **5**(1): p. 35.
109. Huang, Y., et al., *Effect of high-dose methotrexate chemotherapy on intestinal Bifidobacteria, Lactobacillus and Escherichia coli in children with acute lymphoblastic leukemia*. Exp Biol Med (Maywood), 2012. **237**(3): p. 305-11.

Table 1. Description of clinical characteristics of animals according to their groups at different timepoints

Timepoints	Groups					
	Controls		Non-treated		Treated	
	<i>n</i>	mean ± SEM	<i>n</i>	mean ± SEM	<i>n</i>	mean ± SEM
<i>Timelapse after graft (day)</i>						
At the time-to-leukemia	8	52 ± 0	15	52 ± 0	15	52 ± 8
Post-treatment (short-term)	4	119 ± 4	-	-	15	100 ± 2*
OGTT ^a	8	96 ± 9	15	68 ± 1***	15	111 ± 2*
Sacrifice ^a	8	135 ± 4	15	88 ± 2***	15	127 ± 2
<i>CD45human/CD45total concentration (%)</i>						
At the time-to-leukemia	8	0 ± 0	15	10.2 ± 0.8*	15	10.1 ± 0.9*
Post-treatment (short-term)	8	0 ± 0	-	-	15	2.2 ± 0.4*
Sacrifice ^a	8	0 ± 0	15	70.9 ± 1.1**	15	29.3 ± 3.9*
<i>Body weight (g)</i>						
At the time-to-leukemia	8	28.3 ± 2.0	15	27.6 ± 1.1	15	26.9 ± 0.8
Post-treatment (short-term)	4	29.3 ± 1.9	-	-	15	28.3 ± 0.7
Sacrifice ^a	8	30.3 ± 1.8	15	29.2 ± 0.9	15	28.6 ± 0.8
<i>Mesenteric adipose tissue weight (g)</i>						
Sacrifice ^a	8	0.28 ± 0.05	15	0.22 ± 0.02	15	0.19 ± 0.03
<i>Other^b adipose tissue weight (g)</i>						
Sacrifice ^a	8	0.35 ± 0.05	15	0.40 ± 0.05	15	0.28 ± 0.04

Description of timelapse after graft and clinical characteristics ([CD45human/CD45total]%, body weight and adipose tissue) of studied animals according to their groups (controls; non-treated; treated) at assessment timepoints (at diagnostic; post-treatment (short-term); OGTT; and sacrifice). A total of 38 mice were included in the analysis. Means values were compared between groups using ANOVA and Scheffe correction was used for pairwise *post-hoc* tests. OGTT: oral glucose tolerance test. SEM: standard error of means.

^aOGTT and Sacrifice represent the assessment timepoints at which the long-term effects of the disease and treatment can be compared between groups.

^bOther adipose tissue represents the sum of inguinal, epididymal and perirenal adipose tissues.

*p<0.05 vs. controls.

***p<0.001 vs. controls and treated.

**p<0.001 vs. treated.

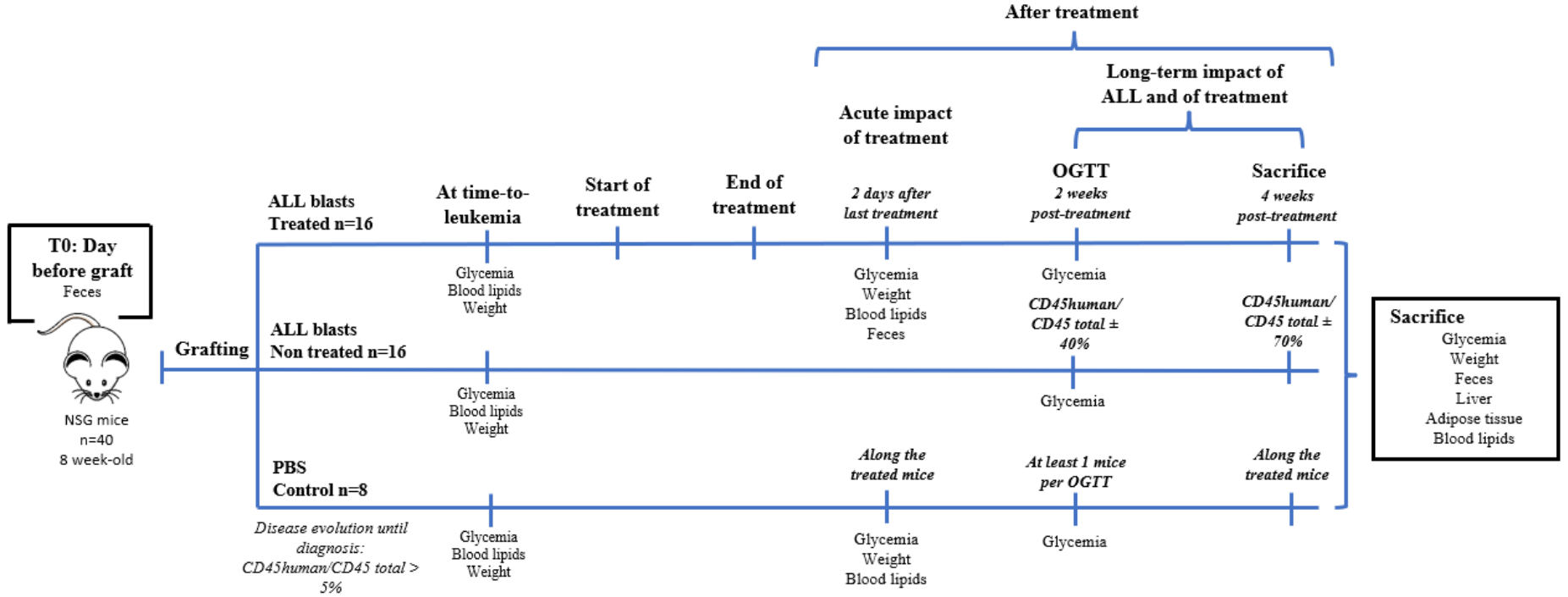


Figure 1. Illustration of the study protocol. A total of 40 NSG mice were separated in 3 groups (control mice, n=8; non treated mice, n=16 and treated mice, n=16). At 8-week-old, mice were grafted with ALL blast or PBS. Mice belonging to the treated group were treated with methotrexate for an 8-week period after detection of circulation leukemic cells (time-to-leukemia). OGTT and sacrifice was performed as described in the **Methods** section. Information about each timepoint and sample collected during the experiment are shown in this diagram.

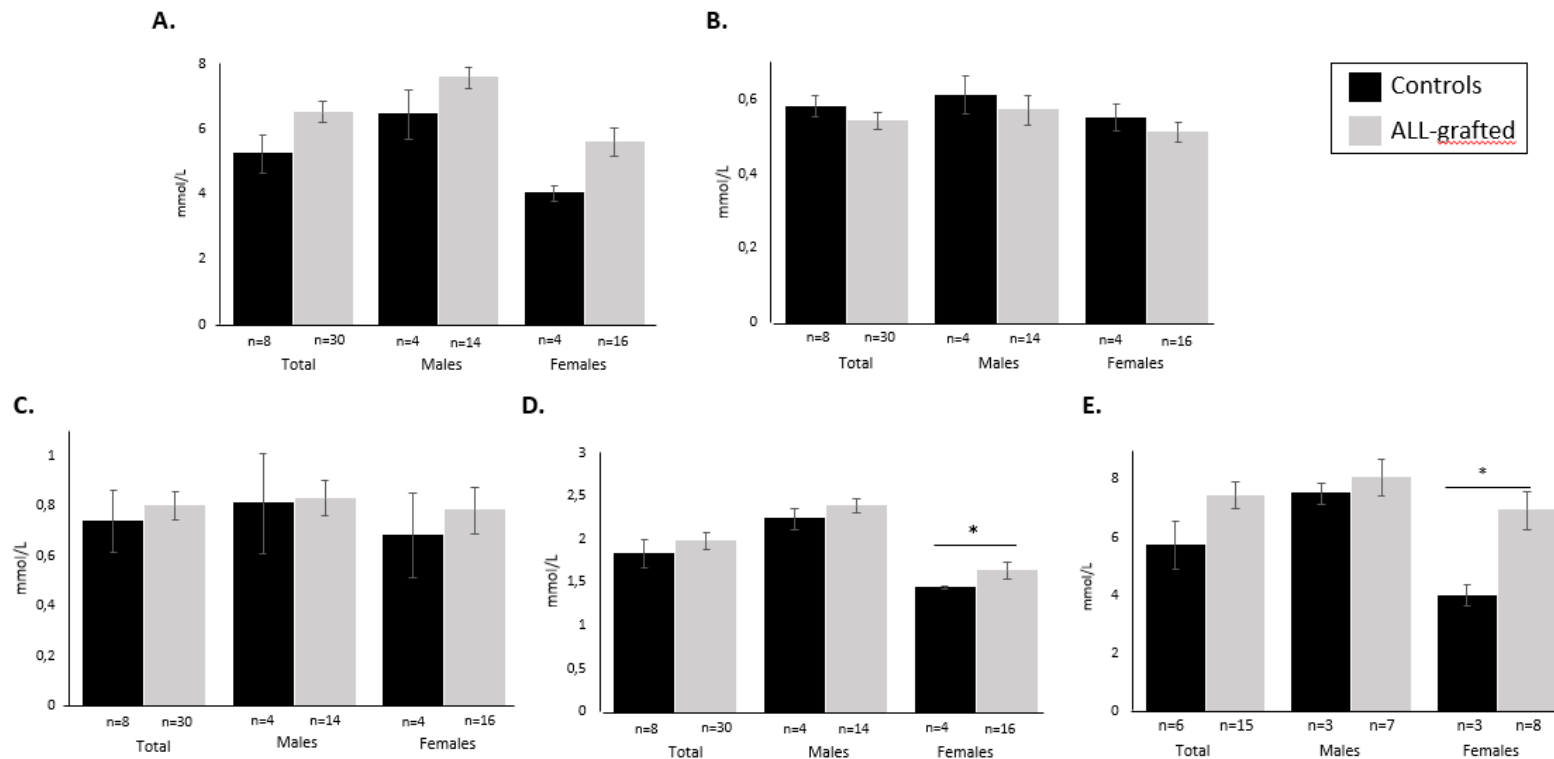


Figure 2. ALL impact at time-to-leukemia and acute effect of treatment on glucose and lipid metabolism. Mean difference of (A) Glycemia at diagnosis, (B) TG plasma levels at time-to-leukemia, (C) HDL-c plasma levels at time-to-leukemia, (D) TC plasma levels at time-to-leukemia and (E) Glycemia in the acute phase after the treatment were compared between control mice and mice grafted with ALL. Results were analyzed using Student t-test or Mann-Whitney test. Data are expressed as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$.

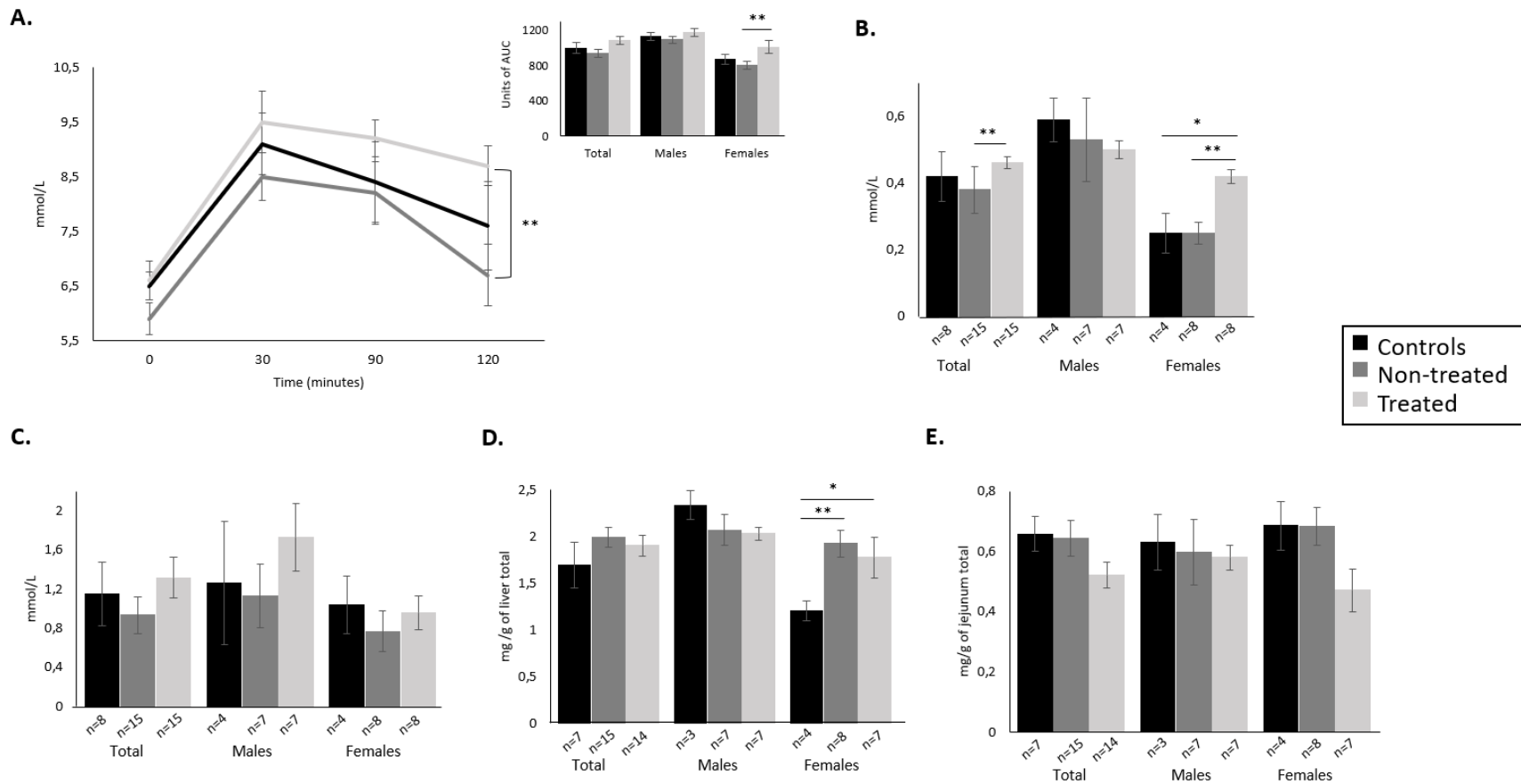


Figure 3. Long-term impact of ALL and of methotrexate treatment on glucose and lipid metabolism. Mean difference of **(A) Glycemia during oral glucose tolerance test** at 0, 30, 90 and 120 minutes and the **total glycemic evolution**, **(B) HDL-c plasma levels at sacrifice**, **(C) TC plasma levels at sacrifice**, **(D) TC in liver at sacrifice** and **(E) TC in jejunum at sacrifice** was compared between groups and analyzed using ANOVA analysis followed by Scheffe post-hoc test or Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney test. Data are expressed as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$. AUC: area under the curve; HDL-c: high-density lipoprotein cholesterol; TC: total cholesterol; SEM: standard error of means.

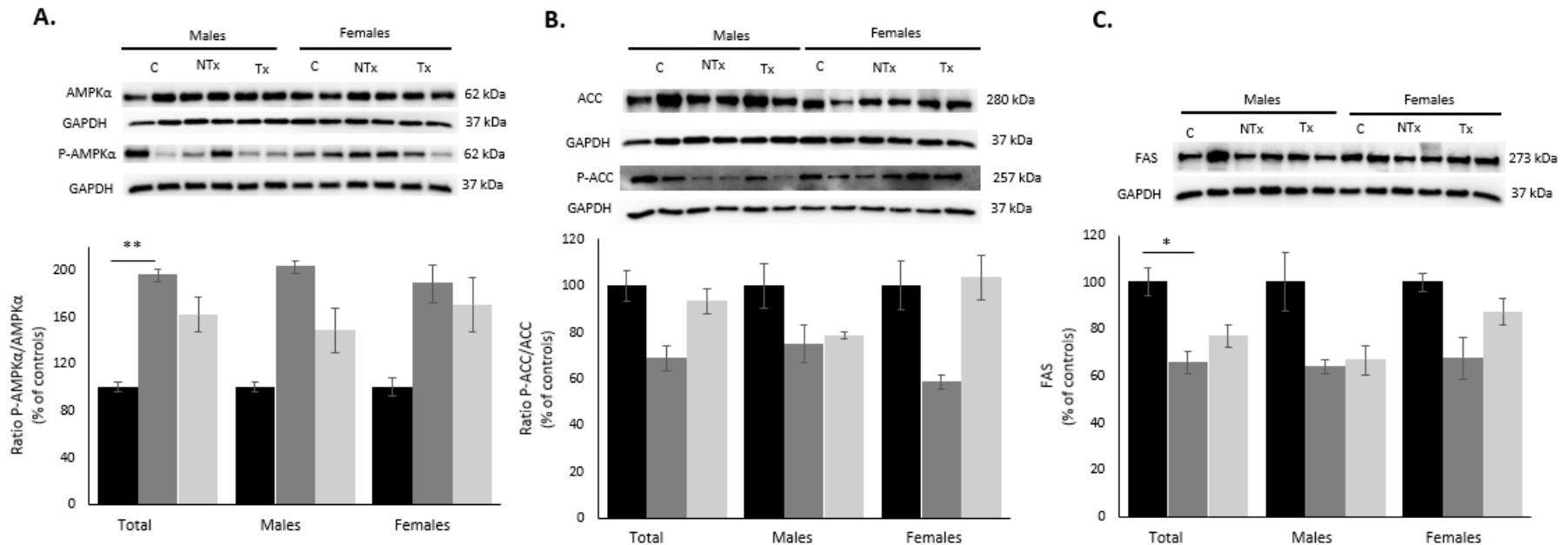
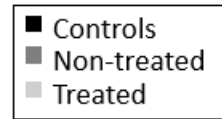


Figure 4. Long-term impact of ALL and of methotrexate treatment on key protein implicated in hepatic energy and lipid metabolism. Protein expression of (A) P-AMPKα/AMPKα ratio, (B) P-ACC/ACC ratio, (C) FAS was determined by Western blot as described in Methods section. Each protein of interest was normalized by the protein of reference GAPDH, blotted on the same gel. Mean difference was compared between group and analyzed by ANOVA analysis followed by Scheffe post-hoc test or Kruskal-Wallis test (only for P-AMPKα/AMPKα ratio). Results are expressed as mean ± SEM for n=5-8/group for phosphorylated/total form ratio with a representative gel per experiment. C: Control, NTx: Non-treated, Tx: Treated. **p≤0.01.

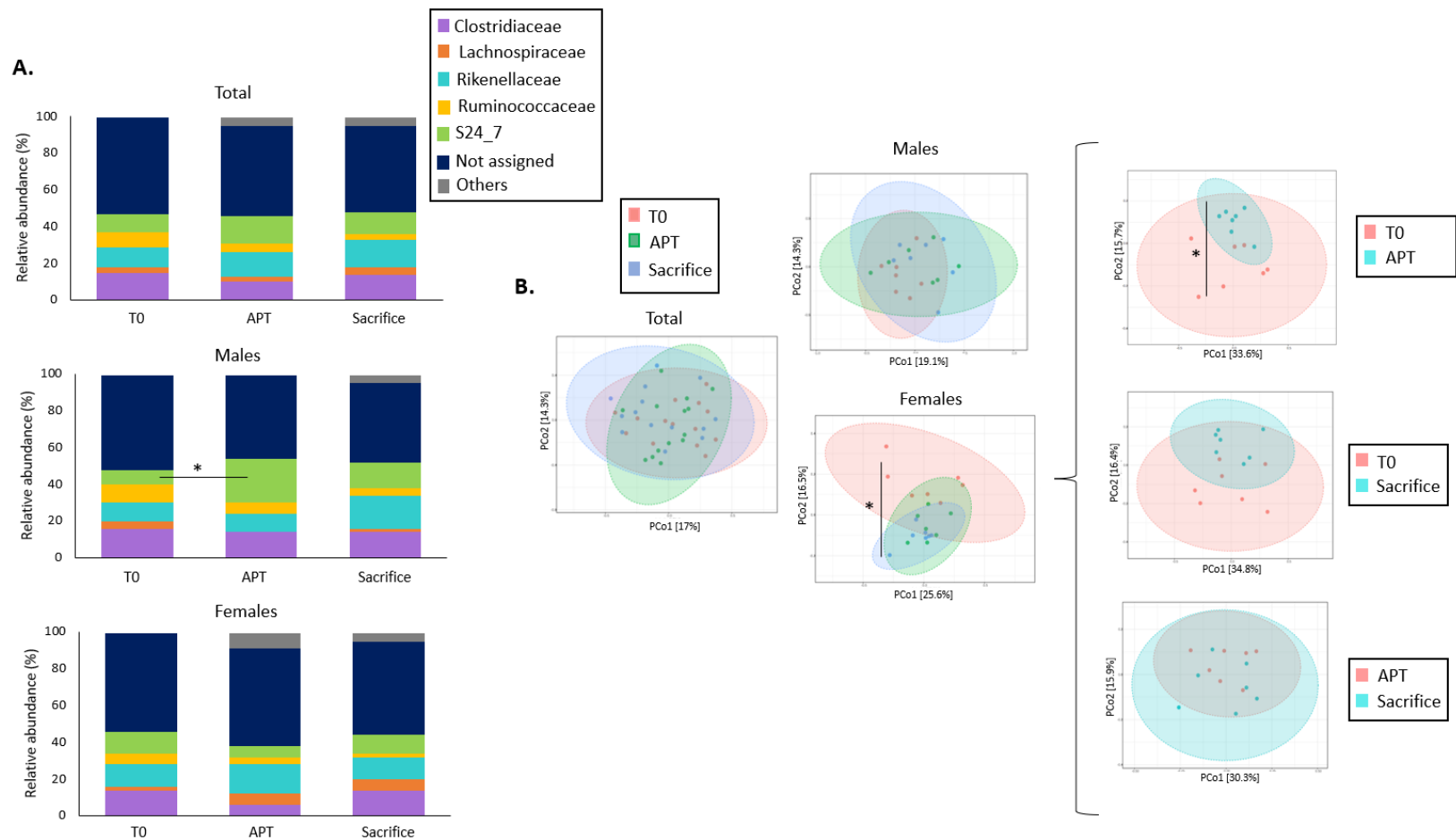


Figure 5. Relative abundance and β -diversity of gut microbiota at different time points during experiment for the treated group. Microbial DNA was extracted from stool samples and data related to **(A) Relative abundance (%) of bacterial family and stratified by sex**, and **(B) β -diversity at different timepoints for the treated group and stratified by sex** were compared between timepoints repeated measure ANOVA analysis or with Permutational ANOVA (PERMANOVA). P -value ≤ 0.05 was considered statistically significant. Data are expressed as 2-D Principle Coordinate Analysis (PCoA) diagram with Bray distance for β -diversity or as mean for relative abundance. T0: Before graft, APT: Acute phase after the treatment. * $p \leq 0.05$.

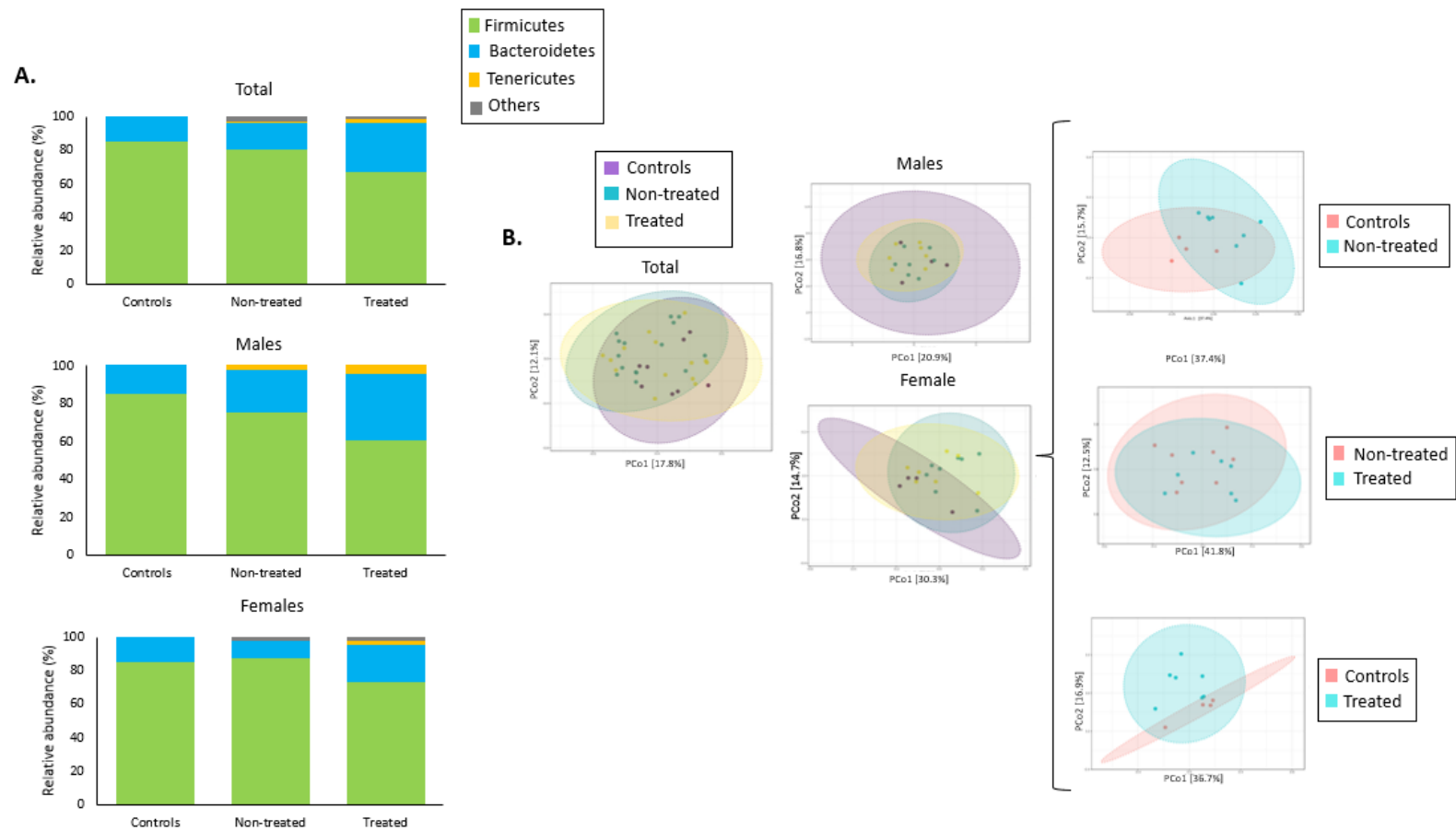


Figure 6. Long-term impact of ALL and of methotrexate on β -diversity and relative abundance of gut microbiota at sacrifice. Microbial DNA was extracted from stool samples and **(A) Relative abundance (%) of Firmicutes, Bacteroidetes, Tenericutes and Other phylum and stratified by sex and (B) Beta-diversity of each group and stratified by sex** was compared between groups using Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney and Permutational ANOVA (PERMANOVA). Data are expressed as mean for relative abundance or as 2-D Principle Coordinate Analysis (PCoA) diagram with Bray distance for β -diversity. Controls: n=8 (n=4/sex), Non treated: n=15 (n=7-8/sex), Treated: n=14 (n=7/sex). **p \leq 0.01.

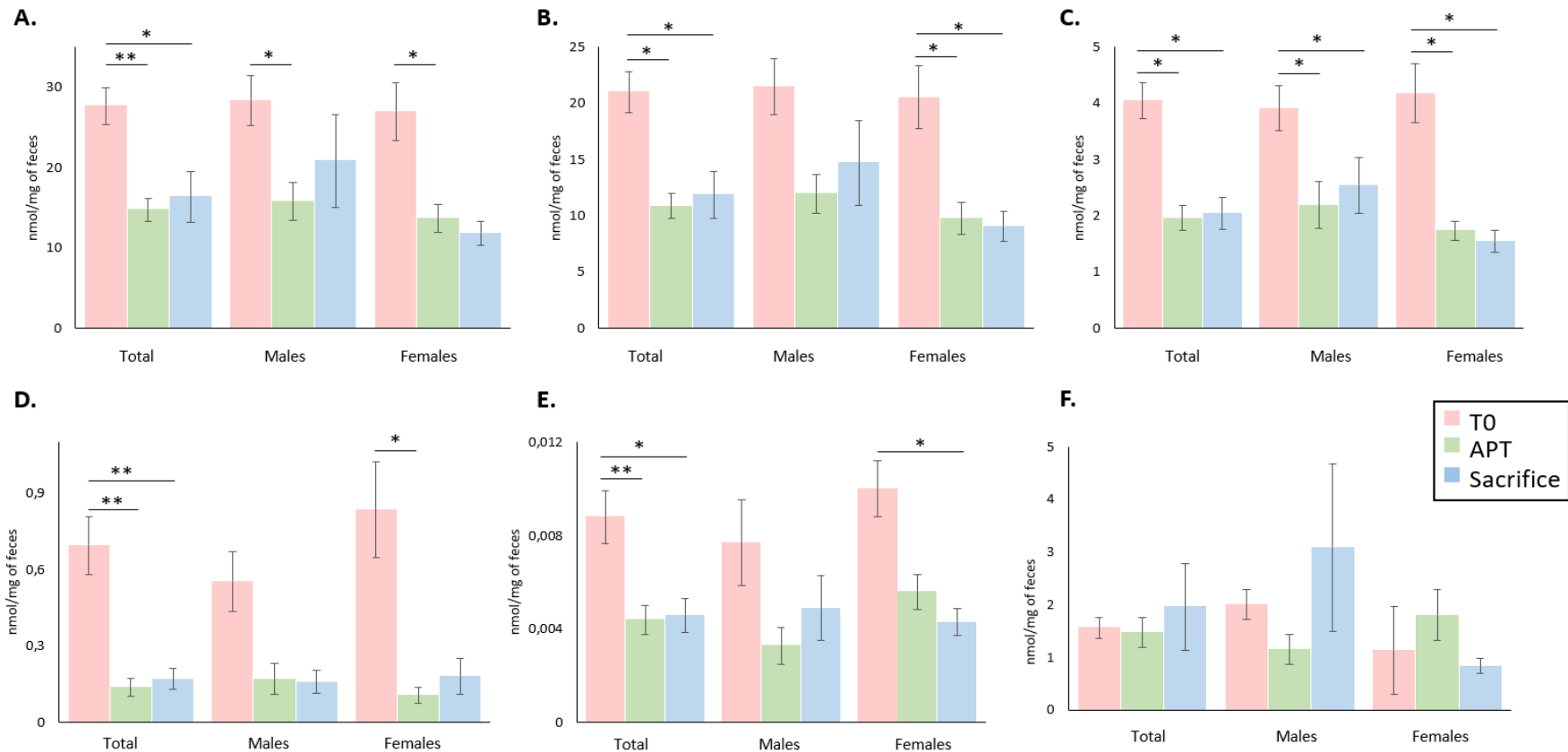


Figure 7. Fecal SCFA variation at different time points during experiment for the treated group. Mean (A) Total SCFA (sum of Acetic, Propionic, Lactic, Butyric, Isobutyric, Valeric, Isovaleric, Caproic, Succinic acids values), (B) Acetate, (C) Propionate, (D) Butyrate, (E) Lactate and (F) Caproate were measured using gas chromatography. Differences between the 3 timepoints were analyzed by repeated measure ANOVA analysis or Friedman test followed by Wilcoxon signed rank test. N=14 (n=7/sex) for the treated group at each time point. Data are expressed as the mean \pm SEM. * p <0.05, ** p <0.01. T0: Before graft, APT: Acute phase after the treatment.

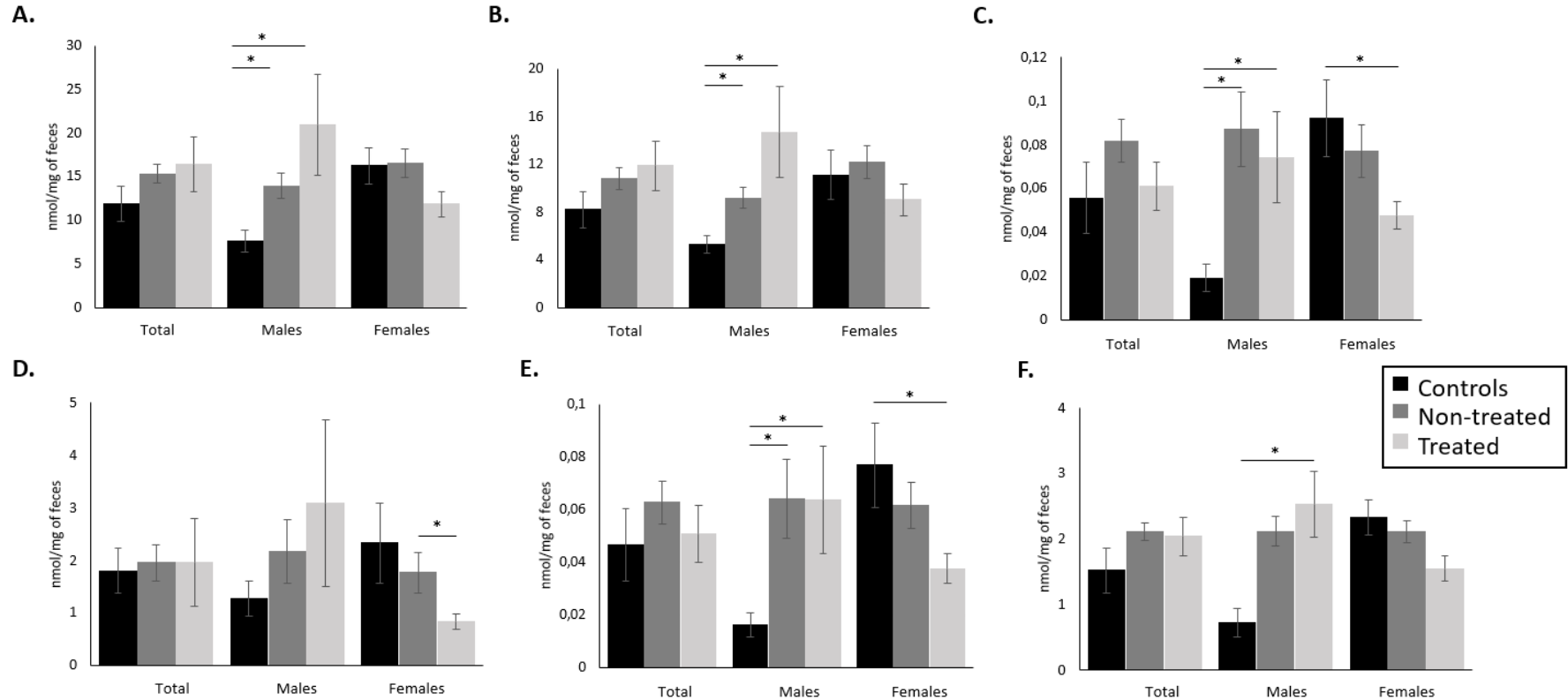


Figure 8. Long-term impact of ALL and of methotrexate treatment on fecal SCFA levels at sacrifice. Short chain fatty acid (SCFA) in feces such as **(A) Total SCFA** (sum of Acetic, Propionic, Lactic, Butyric, Isobutyric, Valeric, Isovaleric, Caproic, Succinic acids values), **(B) Acetate**, **(C) Propionate**, **(D) Butyrate**, **(E) Isovalerate**, **(F) Isobutyrate** were measured at sacrifice using gas chromatography and mean were compared between groups using ANOVA followed by Scheffe post-hoc test or Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney. Controls: n=8 (n=4/sex), Non treated: n=15 (n=7-8/sex), Treated: n=14 (n=7/sex). Data are expressed as the mean \pm SEM. *P*-value \leq 0.05 was considered statistically significant. **p* \leq 0.05.

Supplementary Table 1. Dilution of antibodies used in the study.

Antibody	Molecular Weight	Dilution	Provenance
Acetyl-CoA Carboxylase (ACC)	280 kDa	1:1000 in 5% BSA	Cell Signaling (Danvers, Massachusetts, USA)
Anti-phospho-Acetyl CoA Carboxylase (Ser 79) (P-ACC)	257 kDa	1 : 500 in milk 2%	EDM Milipore Corporation (Temecula, CA, USA)
Fatty acid synthase (FAS)	273 kDa	1: 1000 in 5% BSA	Cell Signaling (Danvers, Massachusetts, USA)
Carnitine palmitoyl transferase 1 isoform A (CPT1A)	88 kDa	1 : 5000 in milk 2%	ThermoFisher scientific (Waltham, MA, USA)
AMP-activated protein kinase α (AMPK α)	62 kDa	1: 2000 in 5% BSA	Cell Signaling (Danvers, Massachusetts, USA)
Phosphorylated AMPK α Thr172 (P-AMPK α)	62 kDa	1: 1000 in 5% BSA	Cell Signaling (Danvers, Massachusetts, USA)
Akt	60 kDa	1:2000 in 5% BSA	Cell Signaling (Danvers, Massachusetts, USA)
Phosphorylated Akt (P-Akt)	60 kDa	1:1000 in milk 2%	ThermoFisher scientific (Waltham, MA, USA)
p38 MAPK Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody (p38)	43 kDa	1: 1000 in 5% BSA	ThermoFisher scientific (Waltham, MA, USA)
Phosphorylated p38 MAPK Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody (P-p38)	43 kDa	1:1000 in 5% BSA	Cell Signaling (Danvers, Massachusetts, USA)
Anti-GAPDH Mab (GAPDH)	37 kDa	1:1 000 000 in milk 2%	ThermoFisher scientific (Waltham, MA, USA)

Supplementary Table 2. Description of clinical characteristics of animals according to their groups and sex at different timepoints during study.

Timepoints	Groups											
	Controls				Non-treated				Treated			
	M		F		M		F		M		F	
	<i>n</i>	mean ± SEM	<i>n</i>	mean ± SEM	<i>n</i>	mean ± SEM	<i>n</i>	mean ± SEM	<i>n</i>	mean ± SEM	<i>n</i>	mean ± SEM
<i>Timelapse after graft (days)</i>												
At time-to-leukemia	4	52 ± 0	4	52 ± 0	7	52 ± 0**	8	52 ± 0**	7	49 ± 0*	8	49 ± 0*
Post-treatment (short-term)	2	119 ± 7.1	2	119 ± 7.1	-	-	-	-	7	97 ± 0.0	8	103 ± 3.9*
OGTT ^a	4	98 ± 15	4	94 ± 12.5	7	67 ± 1.1***	8	67 ± 1.1***	7	108 ± 0.0	8	114 ± 3.5*
Sacrifice ^a	4	135 ± 6.0	4	135 ± 6.0	7	83 ± 0.8***	8	93 ± 1.1***	7	124 ± 0.4*	8	130 ± 3.5
<i>CD45human/CD45total concentration (%)</i>												
At time-to-leukemia	4	0 ± 0	4	0 ± 0	7	11.30 ± 1.2*	8	9.30 ± 1.0 *	7	10.8 ± 0.5*	8	9.5 ± 1.7*
Post-treatment (short-term)	4	0 ± 0	4	0 ± 0	-	-	-	-	7	3.31 ± 0.5*	8	1.24 ± 0.2*
Sacrifice ^a	4	0 ± 0	4	0 ± 0	7	73.3 ± 1.1*	8	68.5 ± 1.2*	7	41.5 ± 3.7*	8	18.5 ± 3.4*
<i>Body weight (g)</i>												
At time-to-leukemia	4	33.4 ± 1.3		23.3 ± 0.6	7	31.0 ± 1.1	8	24.6 ± 0.7	7	29.5 ± 0.8	8	24.6 ± 0.5
Post-treatment (short-term)	2	33.6 ± 1.4	2	25.0 ± 1.0	-	-	-	-	7	30.7 ± 0.7	8	26.2 ± 0.5
Sacrifice ^a	4	34.8 ± 1.1	4	25.9 ± 0.6	7	31.7 ± 1.2	8	27.0 ± 0.7	7	31.1 ± 0.8	8	26.3 ± 0.5
<i>Mesenteric adipose tissue weight (g)</i>												
Sacrifice ^a	4	0.31 ± 0.08	4	0.24 ± 0.07	7	0.21 ± 0.03	8	0.23 ± 0.04	7	0.20 ± 0.02	8	0.18 ± 0.05
<i>Other adipose tissue^b weight (g)</i>												
Sacrifice ^a	4	0.45 ± 0.06	4	0.25 ± 0.04	7	0.40 ± 0.07	8	0.39 ± 0.07	7	0.36 ± 0.06	8	0.20 ± 0.05

Description of timelapse after graft and clinical characteristics ([CD45human/CD45total]%, body weight and adipose tissue) of studied animals according to their groups (controls; non-treated; treated) and sex at the assessment timepoint (At time-to-leukemia; post-treatment (short-term); OGTT; and sacrifice). A total of 38 mice were included in the analysis and results are represented according to their sex. Means values of females and males were compared between groups using ANOVA and Scheffe correction was used for pairwise *post-hoc* tests. OGTT: oral glucose tolerance test. SEM: standard error of means.

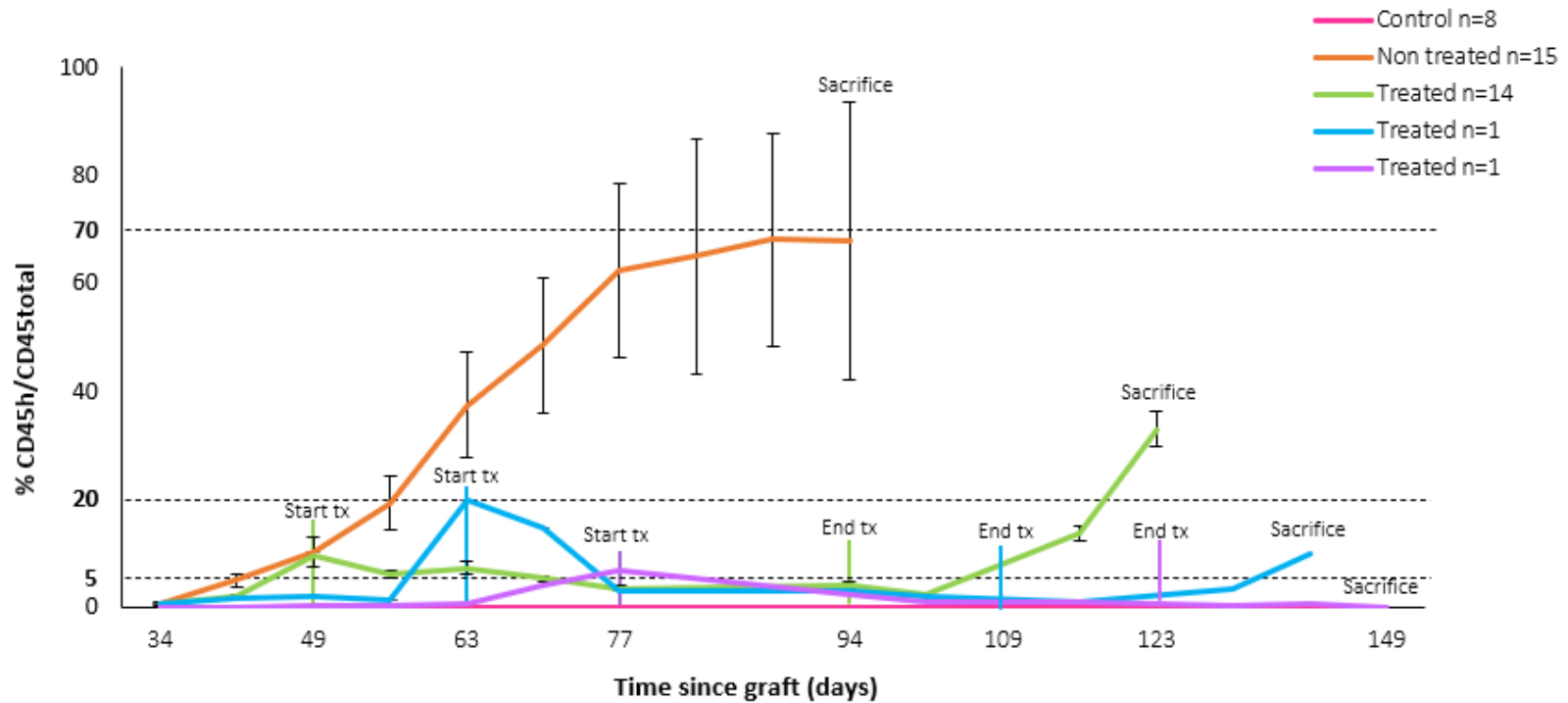
^aOGTT and Sacrifice represent the assessment timepoints at which the long-term effects of the disease and treatment can be compared between groups.

^bOther adipose tissue represents the sum of inguinal, epididymal and perirenal adipose tissues.

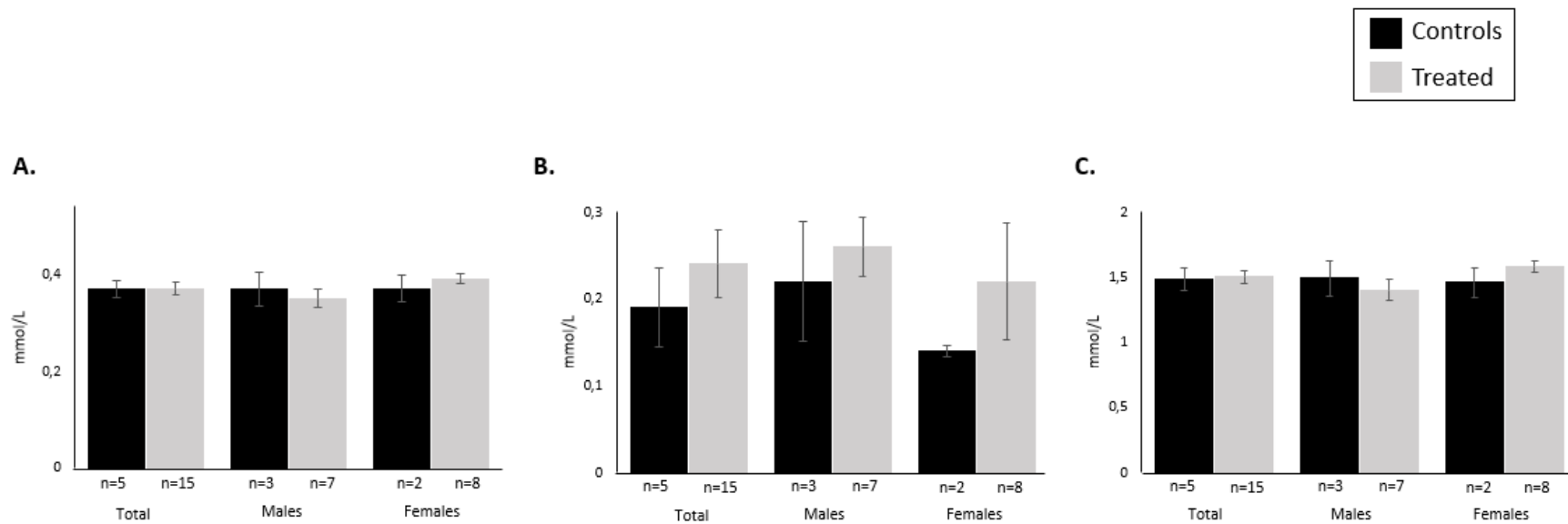
* $p < 0.05$ vs. controls of the same sex.

** $p < 0.001$ vs. treated of the same sex.

*** $p < 0.001$ vs controls and treated of the same sex

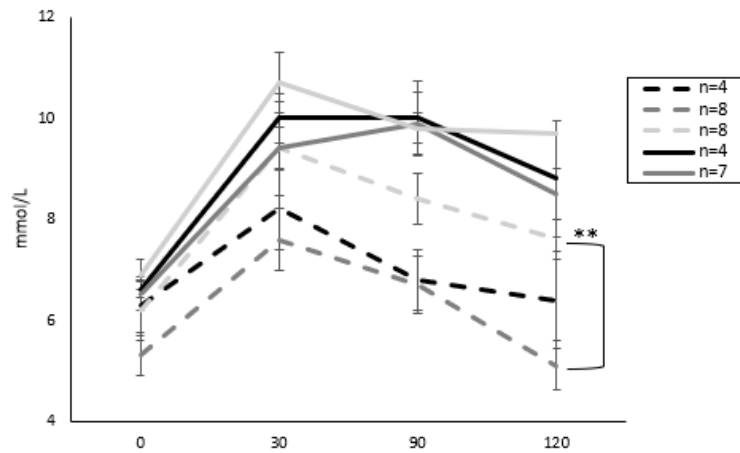


Supplementary Figure 1. Disease evolution (%CD45 human/CD45 total) in days of Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) in NSG mice. Mean % of CD45human/CD45 total (human+murin) in peripheral blood assessed weekly by flow cytometry during experimental protocol. Controls (n=8), non-treated (n=15), treated (n=16). Vertical dash line represent threshold for disease diagnosis (5%), methotrexate efficacy (20%) and sacrifice indication for non-treated mice (70%). Data are expressed as mean \pm SEM.

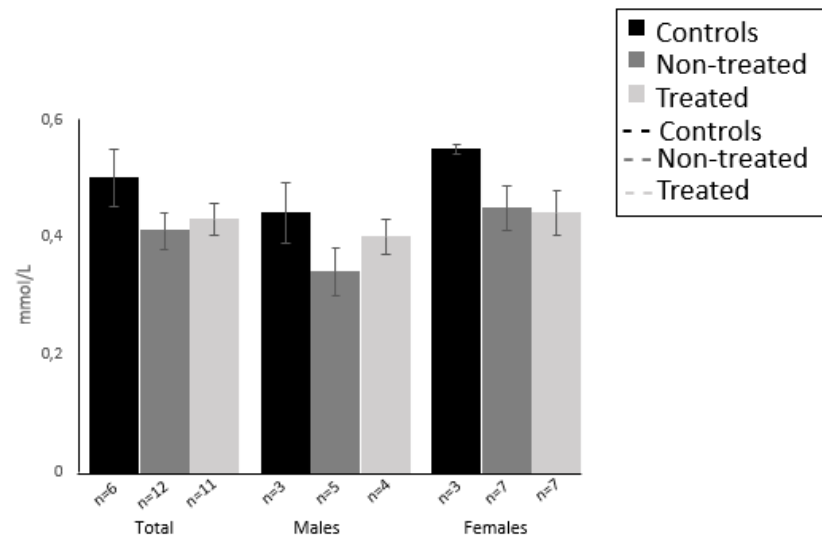


Supplementary Figure 2. Acute impact of methotrexate treatment on lipid metabolism. Mean difference of (A) TG plasma levels, (B) HDL-c plasma levels and (C) TC plasma levels were compared between control and treated mice. Results were analyzed using Student t-test or Mann-Whitney test. Data are expressed as the mean \pm SEM. P-value \leq 0.05 was considered statistically significant.

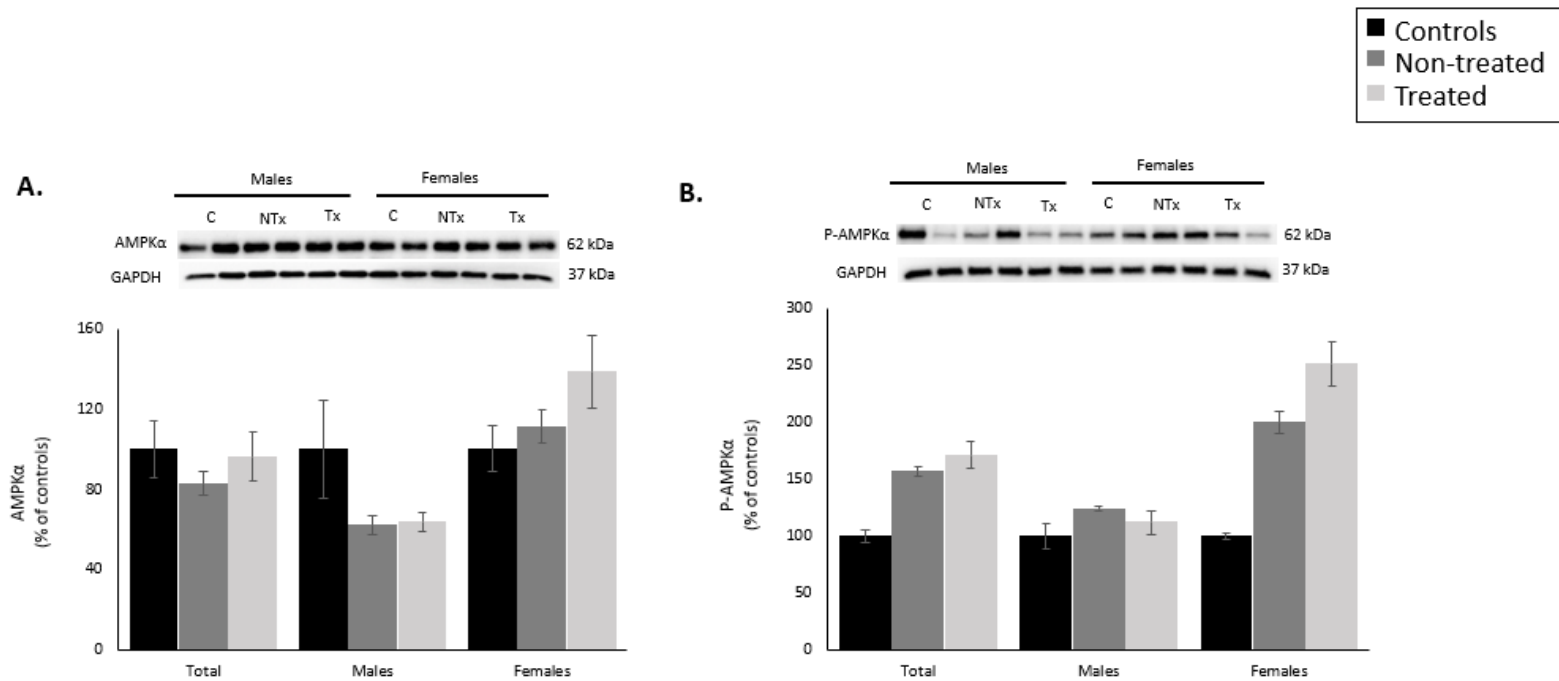
A.



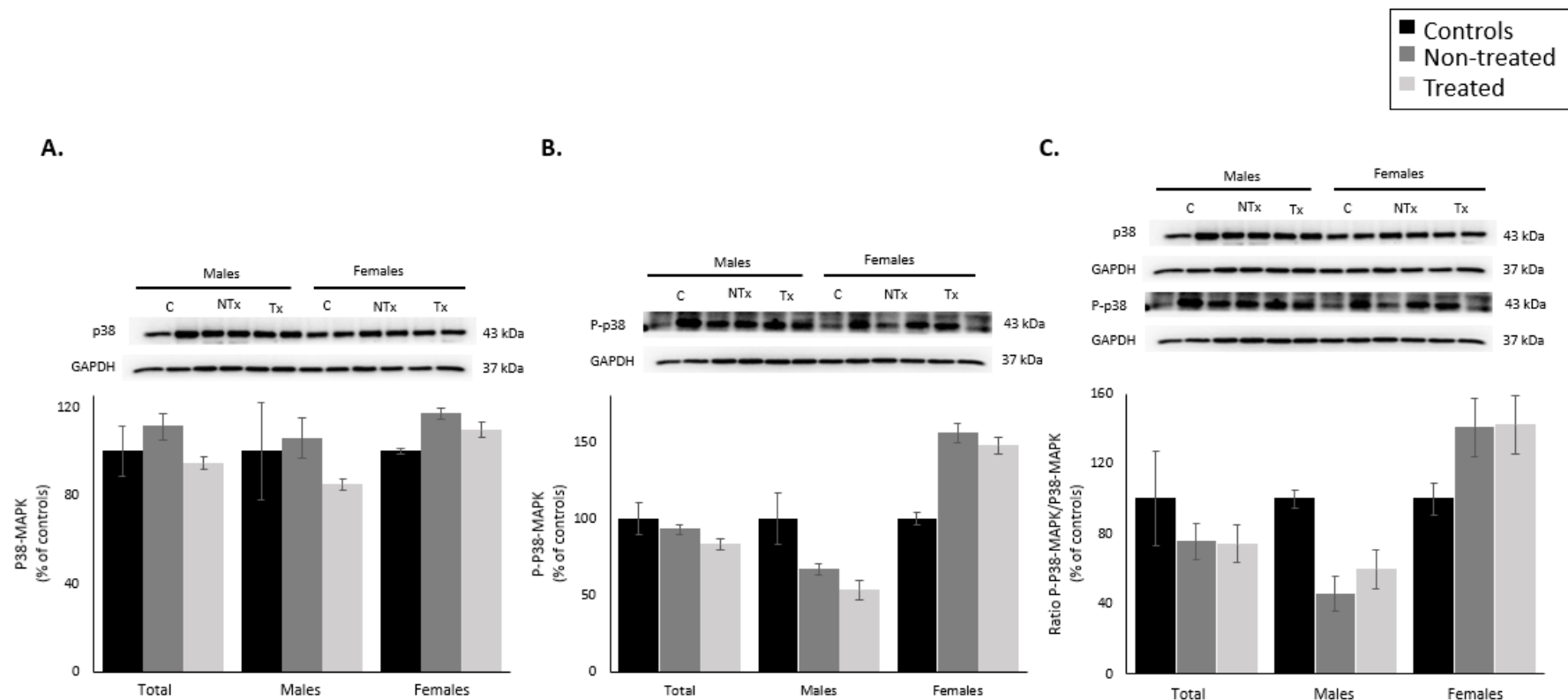
B.



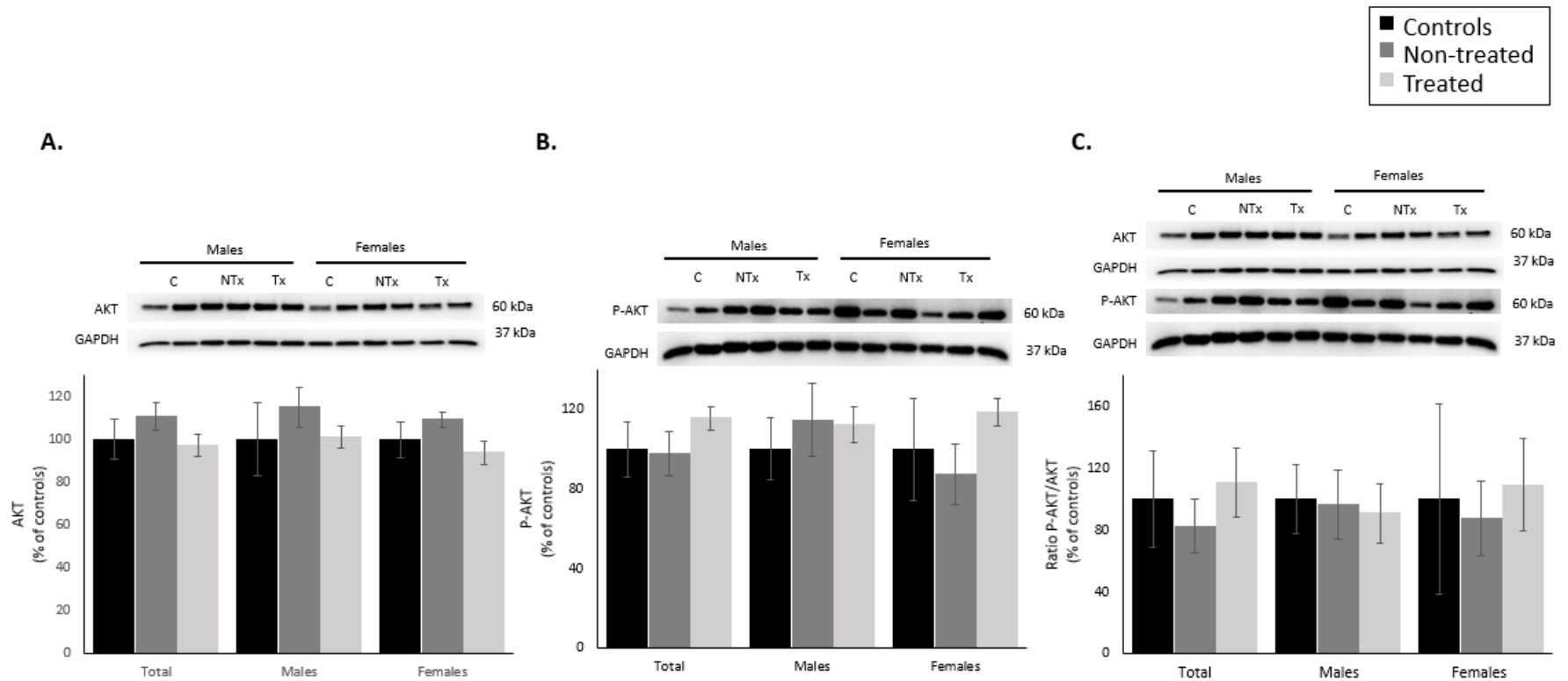
Supplementary Figure 3. Long-term impact of ALL and of methotrexate treatment glucose and lipid metabolism. Mean difference of **(A) Glycemia of male (—) and female (- -) mice during Oral glucose tolerance test (OGTT)**, performed as described in Methods section was measured at 0, 30, 90 and 120 minutes for each group and **(B) TG plasma levels at sacrifice** was compared between groups and analyzed using ANOVA analysis followed by Scheffe post-hoc test or Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney test. Data are expressed as mean \pm SEM. ** $p \leq 0.01$.



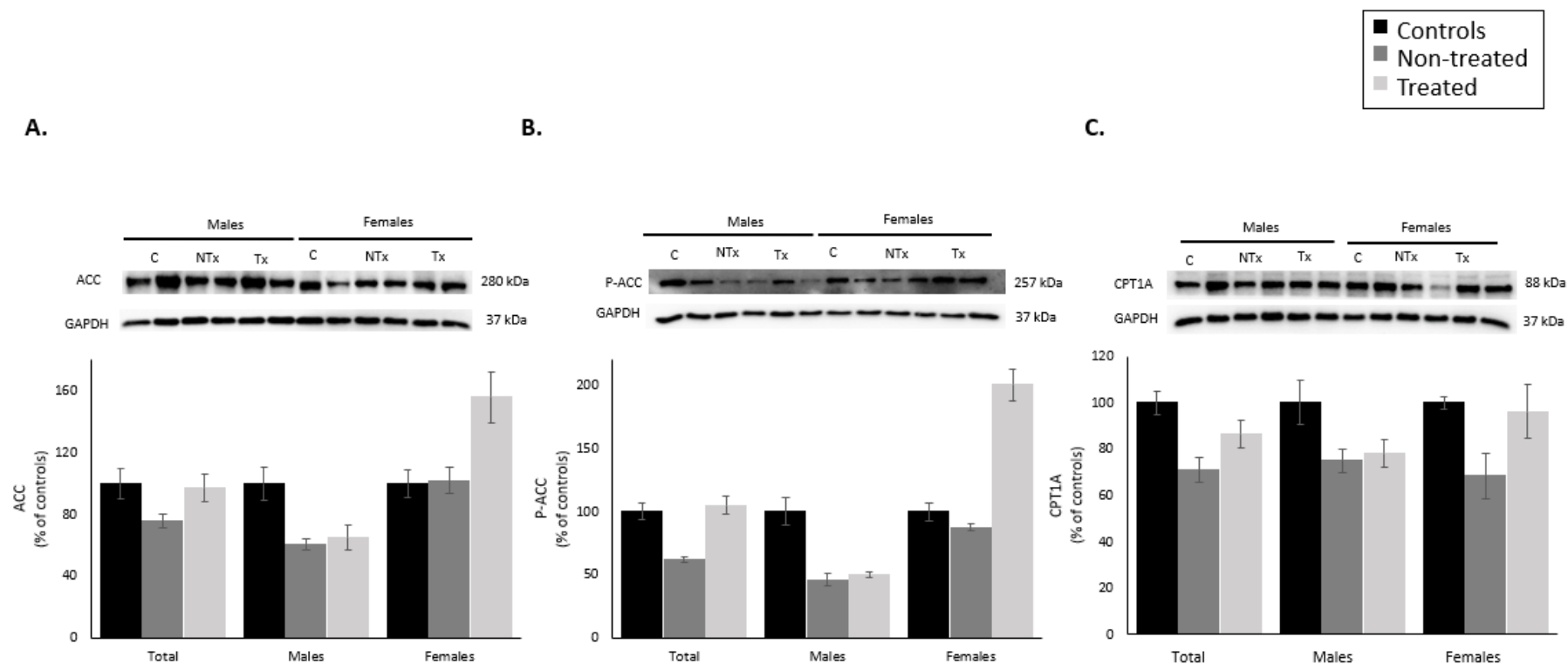
Supplementary Figure 4. Long-term impact of ALL and of methotrexate treatment on key protein implicated in hepatic energy metabolism. Protein expression of (A) **AMPKα** and (B) **P-AMPKα** was determined by Western blot as described in Methods section. Each protein of interest was normalized by the protein of reference GAPDH, blotted on the same gel. Mean difference was compared between group and analyzed by ANOVA analysis followed by Scheffe post-hoc test. Results are expressed as mean \pm SEM for n=5-8/group with a representative gel per experiment. C: Control, NTx: Non-treated, Tx: Treated. P-value \leq 0.05 was considered statistically significant.



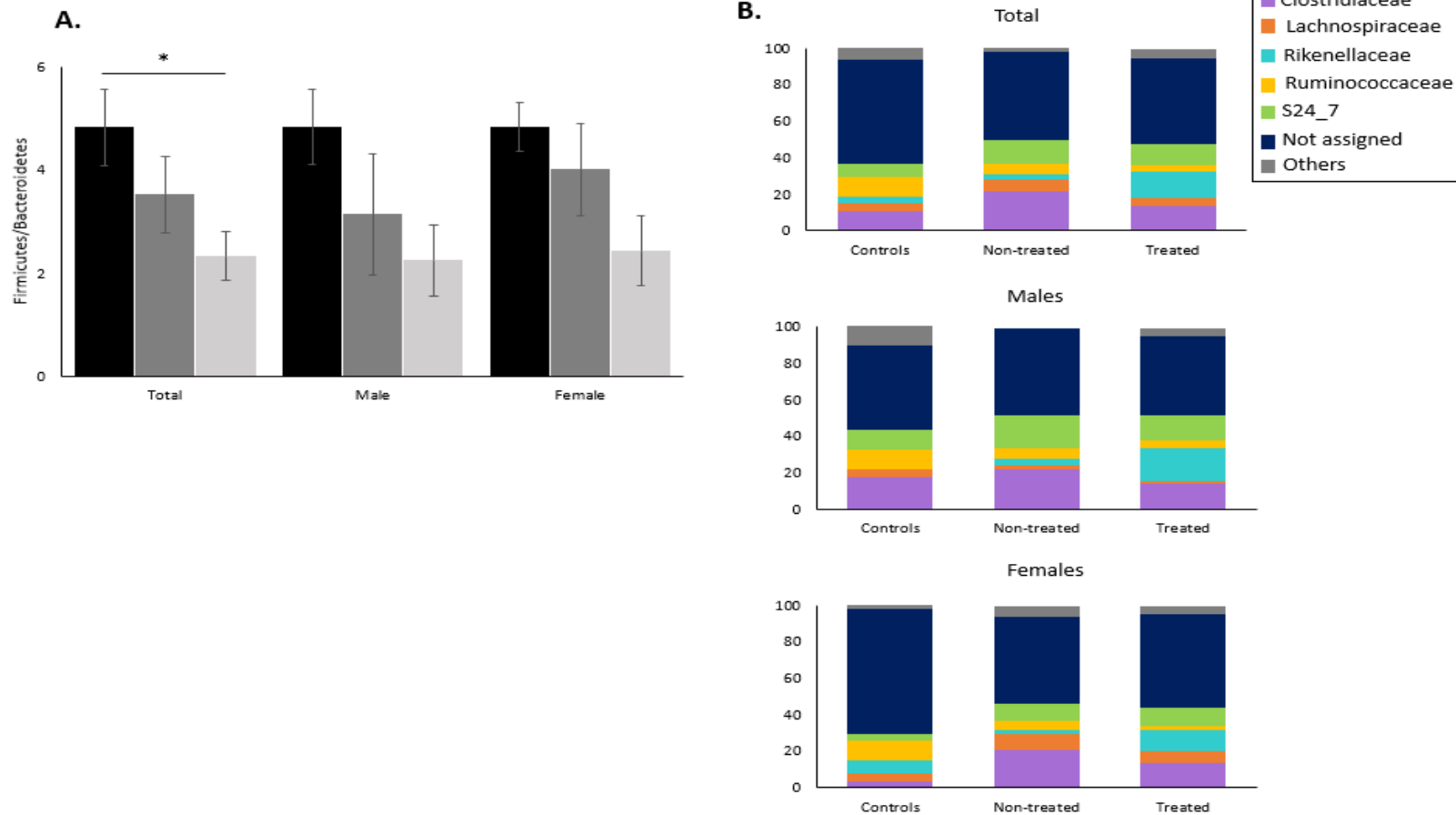
Supplementary Figure 5. Long-term impact of ALL and of methotrexate treatment on key protein implicated in hepatic glucose metabolism. Protein expression of **(A) P38-MAPK**, **(B) P-P38-MAPK** and **(C) P-P38-MAPK/P38-MAPK** ratio was determined by Western blot as described in Methods section. Each protein of interest was normalized by the protein of reference GAPDH, blotted on the same gel. Mean difference was compared between group and analyzed by ANOVA analysis followed by Scheffe post-hoc test. Results are expressed as mean \pm SEM for n=5-8/group with a representative gel per experiment. C: Control, NTx: Non-treated, Tx: Treated. P-value \leq 0.05 was considered statistically significant.



Supplementary Figure 6. Long-term impact of ALL and of methotrexate treatment on key protein implicated in hepatic glucose metabolism. Protein expression of **(A) AKT**, **(B) P-AKT** and **(C) P-AKT/AKT ratio** was determined by Western blot as described in Methods section. Each protein of interest was normalized by the protein of reference GAPDH, blotted on the same gel. Mean difference was compared between group and analyzed by ANOVA analysis followed by Scheffe post-hoc test. Results are expressed as mean \pm SEM for n=5-8/group with a representative gel per experiment. C: Control, NTx: Non-treated, Tx: Treated. P-value \leq 0.05 was considered statistically significant.



Supplementary Figure 7. Long-term impact of ALL and of methotrexate treatment on key protein implicated in hepatic lipid metabolism. Protein expression of **(A) ACC**, **(B) P-ACC** and **(C) P-ACC/ACC ratio** was determined by Western blot as described in Methods section. Each protein of interest was normalized by the protein of reference GAPDH, blotted on the same gel. Mean difference was compared between group and analyzed by ANOVA analysis followed by Scheffe post-hoc test. Results are expressed as mean \pm SEM for n=5-8/group with a representative gel per experiment. C: Control, NTx: Non-treated, Tx: Treated. P-value \leq 0.05 was considered statistically significant.



Supplementary Figure 8. Long-term impact of ALL and of methotrexate on relative abundance of gut microbiota at sacrifice. Microbial DNA was extracted from stool samples and **(A) Firmicutes/Bacteroidetes ratio** and **(B) Relative abundance of bacterial family and stratified by sex** was compared between groups using ANOVA or Kruskal-Wallis test. Controls: n=6-8 (n=3-4/sex), Non treated: n=9-15 (n=4-8/sex), Treated: n=11-14 (n=5-7/sex). Data are expressed as the mean \pm SEM. **p \leq 0.05

Chapitre 6 – Discussion

À la lumière des résultats de l'étude menée dans le cadre de ce mémoire, nous avons démontré que dans un modèle xénogénique de la LLA pédiatrique, la maladie seule a un impact sur la concentration de CT sanguin et hépatique. Les données indiquent également que le méthotrexate a un effet sur le CT hépatique et le HDL-c sanguin, en plus de provoquer une dysglycémie, et ce surtout chez les souris femelles. Plusieurs différences ont été mesurées dans ce groupe soit, des dérégulations dans l'expression protéique de certaines protéines hépatiques impliquées dans le métabolisme des lipides ainsi que dans la composition et la diversité du microbiote intestinal et dans le contenu fécal en AGCC. Ces modulations pourraient expliquer la susceptibilité accrue des femelles leucémiques à développer des complications métaboliques pendant et après les traitements de méthotrexate.

Au fil des dernières années, notre équipe de recherche a contribué à faire avancer les connaissances dans le domaine des complications cardiométaboliques chez les survivants de cancer pédiatrique. Comme mentionné dans la recension des écrits de ce mémoire, l'étude PETALE a mis en lumière que les survivants de cancer pédiatrique ont un risque plus important de souffrir de dyslipidémie, d'hypertension et de SM que la population générale, et ce même en tant qu'adolescent ou jeune adulte [4]. Entre autres, comparativement à des contrôles sains, les patients ayant été traité pour une LLA durant l'enfance ont une prévalence accrue d'hypertriglycémie, de HDL-c bas et de LDL-c élevé, en plus des niveaux d'Apo A-I plus faibles et d'APO B-100 plus élevés [141]. Des analyses sur les HDL ont montré des altérations de leur composition en lipides (concentration plus élevée de TG (HDL₂ et HDL₃) et de cholestérol (HDL₂) chez les survivants dyslipidémiques vs. contrôles sains) et en apolipoprotéines (diminution d'Apo A-I et augmentation d'Apo A-II et d'Apo E dans les HDL₂ chez les survivants dyslipidémiques vs contrôles sains) [141] et de leur profil protéomique (plus de protéines pro-thrombotiques et pro-inflammatoires vs. contrôles) [292]. Ces modifications suggèrent un profil davantage

athérogène de cette lipoprotéine. D'autres études ont été menées pour explorer les possibles mécanismes expliquant la progression de ces problèmes de santé dans une population d'enfants et d'adolescents ayant complété leur traitement antinéoplasique (VIE) et chez les survivants de la LLA de l'enfant (PETALE). Ainsi, il a été possible d'identifier certains facteurs comme l'exposition à certains traitements (l'exposition aux corticostéroïdes et à la RTC [293] et l'exposition à la doxorubicine [205]), la faible adhérence aux recommandations nutritionnelles [137], les biomarqueurs d'inflammation, de SO, de fonction endothéliale et d'endotoxémie métabolique et leur association aux risques cardiométaboliques (obésité, RI, SM) [19]. Des revues de littérature ont également été effectuées afin de constater l'état des connaissances sur la dysbiose intestinale [294] et sur l'impact du SO et de l'inflammations générés durant les traitements [295]. Ceci a également permis d'établir les hypothèses selon lesquelles la dysbiose intestinale et l'état pro-oxydant et pro-inflammatoire seraient des mécanismes potentiellement reliés au développement prématuré des complications cardiométaboliques chez les survivants de cancer pédiatrique. Le projet de recherche présenté dans ce mémoire découle de ces hypothèses et vise à élucider l'impact de la LLA et d'une molécule chimiothérapeutique isolée, le méthotrexate, sur les complications métaboliques. De plus, l'étude de l'expression de protéines clés dans les tissus hépatiques ainsi que l'étude du microbiote intestinal et de son contenu fécal en AGCC comme étant des mécanismes impliqués dans l'évolution des désordres cardiométabolique des patients suivant la fin de leur traitement sont également des objectifs cruciaux de nos travaux.

Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle murin xénogénique de la LLA. Les modèles de souris immunodéficientes, c'est-à-dire qui ont été génétiquement modifiées pour induire une altération du système immunitaire, sont largement utilisées pour tester de nouvelles molécules sur la croissance tumorale [296-299]. En effet, dans ces souris, le potentiel de rejet est réduit et permet le développement optimal de la xéno greffe. Alors que des équipes de recherche se sont intéressées à l'impact du métabolisme sur la carcinopathogénèse [300-303], les effets de la maladie et des traitements sur le métabolisme des glucides et des lipides n'ont pas été étudiés dans un modèle de souris xénogénique. Plusieurs lignées de souris immunodéficientes sont actuellement disponibles sur le marché. Chacune d'entre elles a des particularités et des degrés

d'atteinte du système immunitaire différente. La souris NSG constitue un modèle de choix, car l'inhibition marquée de leur défense immunitaire permet une meilleure réponse suivant une greffe de tissus ou de cellules humaines [278]. Donc, puisqu'il a été démontré que les souris NSG réagissent bien à une xéno greffe et a un traitement chimiothérapeutique visant à freiner l'évolution cancéreuse en plus d'avoir la capacité d'accumuler du gras [285], ce modèle de souris est considéré comme le meilleur modèle pour mener cette étude.

De manière similaire aux perturbations lipidiques observées chez les enfants atteints de la LLA au diagnostic, nos données révèlent que la maladie seule a un impact sur les niveaux sanguins de CT, surtout chez les femelles. En effet, une étude publiée en 2020 incluant 112 patients ayant la LLA pédiatrique, a observé qu'au diagnostic, 98% d'entre eux possédaient des niveaux de HDL-c sanguins bas, 1% avaient des niveaux de LDL-c élevés, 5% présentaient de l'hypercholestérolémie et 58% de l'hypertriglycéridémie, comparativement aux normes de référence des taux de lipides selon le sexe et l'âge [103]. Dans le même ordre d'idées, *Moschovi et al.* ont étudié le profil lipidique de 64 enfants atteints de la LLA et comparés aux valeurs obtenues dans la population pédiatrique grecque, 92% avaient des taux sanguins de HDL-c faibles, 67% avaient des niveaux de LDL-c sanguin élevés, 41% présentaient de l'hypercholestérolémie et 83% de l'hypertriglycéridémie [6]. Comparés à des contrôles en santé, une cohorte d'adultes leucémiques présentait des taux de triglycérides sanguins et de cholestérol transporté dans les lipoprotéines de très faible densité (VLDL-c) supérieurs et des niveaux de HDL-c plus faibles [105]. Contrairement aux études pédiatriques [6, 103], il a été démontré que les adultes leucémiques avaient des taux sanguins de TG et de VLDL-c supérieurs à ceux des contrôles en santé, seulement chez les femmes [105]. À l'opposé des études cliniques chez des enfants ou chez des adultes au diagnostic de LLA, nous n'avons pas observé de différences par rapport au TG plasmatique entre les souris leucémiques et les souris contrôles. Même en l'absence de changements dans la concentration en TG sanguins, la composition lipidique a été associée à un risque accru de maladies métaboliques [304]. Toutefois, des études approfondies en lipidomique n'ont pas été réalisées chez les enfants atteints de la LLA. De manière similaire, les souris leucémiques présentaient une glycémie similaire à celle des souris contrôles alors que *Demedis et al.* ont

rapporté que dans une cohorte de patients (n=220) avec la LLA pédiatrique, 6% d'entre eux présentaient une hyperglycémie au diagnostic [5]. En résumé, les résultats obtenus dans notre modèle animal indiquent que la maladie seule contribue faiblement aux désordres métaboliques associés aux TG sanguins et au métabolisme des glucides au diagnostic. Il est possible que les différences entre le métabolisme des humains et des souris contribuent à expliquer ces discordances. En effet, les souris sont dépourvues de protéines de transfert d'esters de cholestérol (CEPT), ce qui signifie que le HDL est leur principal transporteur de cholestérol [305]. De plus, ces animaux ont une grande résistance au stress métabolique, particulièrement concernant le métabolisme des glucides [285]. Ces informations pourraient fournir des explications quant au faible impact de la maladie sur les paramètres lipidiques et glucidiques observé dans notre modèle animal.

Ensuite, nous avons observé que le méthotrexate a un impact sur les lipides sanguins et sur la glycémie. Nos résultats démontrent que comparativement aux contrôles, les femelles recevant le méthotrexate démontraient des niveaux plasmatiques de HDL-c supérieurs au sacrifice. Une incidence élevée d'hypertriglycéridémie, hypercholestérolémie et de niveaux de HDL-c faibles fait partie des complications cardiométaboliques constatées pendant les traitements [208], peu de temps après la fin des traitements (entre 2 semaines et 5 ans) [6, 306, 307] et même plusieurs années après la fin des traitements [4, 139]. Le risque accru de développer une dyslipidémie, telle que des niveaux élevés de triglycérides sanguins chez les survivants de cancer pédiatrique, a été associé à l'exposition à l'irradiation totale corporelle et à la RTC [134, 308]. Aucune étude n'a relié l'exposition au méthotrexate comme facteur contributif à l'hypertriglycéridémie chez les humains. Ainsi, il n'est pas surprenant de n'avoir observé aucun effet sur les TG sanguins chez les souris traitées. Cependant, puisqu'une modification de la composition en lipides peut entraîner un profil lipidique favorable aux complications métaboliques sans affecter la concentration [304], une étude plus poussée des types de lipides aurait pu être effectuée. Ensuite, nous avons constatés que les souris femelles traitées au méthotrexate avaient des glycémies à jeun supérieures que les souris contrôles, autant durant la phase aiguë après les traitements qu'à long terme (OGTT). Des désordres au niveau du métabolisme du glucose sont aussi observés dans les

études cliniques. En effet, deux études ont souligné qu'entre 3 à 5 ans après la fin des traitements de la LLA pédiatrique, 4-15% des patients avaient une glycémie à jeun élevée, 8% ont développé de l'intolérance au glucose, et 30-35% étaient résistants à l'insuline [10, 307, 309]. Par ailleurs, ces perturbations sont associées à l'administration de l'asparaginase [14] et les agents de la classe des corticostéroïdes [8]. Toutefois, dans le cadre de notre étude, le méthotrexate a causé une élévation de la glycémie à jeun ainsi qu'une intolérance au glucose durant l'OGTT. Plus de recherches visant à mieux comprendre la relation entre le méthotrexate et les complications liées au métabolisme des glucides seraient nécessaires pour élucider ce lien.

Nos travaux ont aussi démontré que dans le foie, la maladie et le méthotrexate engendrent une concentration en CT hépatique supérieure chez les femelles comparativement au groupe contrôle, mais pas de différences pour ce qui est du contenu en TG. L'évaluation de l'expression protéique hépatique a révélé que les souris leucémiques présentaient une activité accrue d'AMPK α , se manifestant par un ratio de P-AMPK α /AMPK α supérieur, et une expression inférieure de FAS que les contrôles. Cependant, ces différences étaient significatives seulement chez les souris non traitées, indiquant un impact important de la maladie sur la modulation de l'expression et de l'activation de ces protéines. Lorsqu'il y a activation de l'AMPK α dans le foie se traduisant par un processus de phosphorylation, cela empêche la formation hépatique *de novo* de glucose et de lipides et favorise l'oxydation lipidique [310], via l'inhibition de l'activation de l'ACC et la stimulation de la β -oxydation [311-313]. FAS détient un rôle dans la synthèse et le stockage des lipides et mène aussi au catabolisme des acides gras en activant la transcription du récepteur alpha activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR α), qui lui active les gènes responsables de la β -oxydation en situation de jeûne [314]. Les changements dans l'expression protéique d'AMPK α et de FAS suggèrent un état catabolique plus important visant à rétablir l'homéostasie énergétique chez les souris leucémiques. Nos résultats démontrent aussi une tendance chez les souris leucémiques à avoir une expression inférieure de CPT1A par rapport aux contrôles. Cette protéine étant impliquée dans la β -oxydation [315] et sa diminution suggère une réduction de l'oxydation lipidique hépatique. Toutefois, nos résultats ne sont pas suffisants pour établir un lien clair entre la maladie, les traitements et leur possible impact sur la β -oxydation.

Des analyses supplémentaires sur la mitochondrie (le ratio ADP/ATP, H₂O₂ et *8-oxoguanine DNA glycosylase* (OGG1)), la mesure du palmitate oxydé à l'aide de la radioactivité et l'expression de d'autres protéines impliquées dans la β -oxydation hépatique (CACT, VLCAD, LCHAD, MCAD, SCAD, ACADL) [316, 317] pourraient être réalisées afin de mieux comprendre ce mécanisme. Ces variations métaboliques pourraient expliquer la disparité entre la dyslipidémie observée chez les survivants de la LLA pédiatrique [141] et ce qui a été reflétée dans notre modèle animal. En résumé, des dérégulations des voies métaboliques associées au métabolisme des lipides ont été observées chez tous les animaux greffés avec la LLA suggérant un effet prédominant de la maladie sur la régulation de l'AMPK α , de FAS et de CPT1A dans le foie.

L'analyse du microbiote intestinal a dévoilé un impact négatif du méthotrexate sur la composition et la diversité bactérienne, principalement chez les femelles. Nous avons observé un changement dans la β -diversité après les traitements de méthotrexate, comparativement aux valeurs obtenues à T0. De plus, les souris ayant reçu le méthotrexate présentaient un ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* inférieur à celui des contrôles. Néanmoins, cet indice devrait être utilisé avec précaution étant donné la variabilité des conclusions des études s'intéressant à l'association de ce ratio avec certains désordres métaboliques [318]. Malgré tout, une réduction du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* a été associée à une dysbiose intestinale [319]. Les *Firmicutes* constitue un ensemble incluant les bactéries à Gram-positif productrice d'AGCC [216, 320] et une diminution de la production d'AGCC pourraient s'avérer défavorable à la santé cardiométabolique [218]. L'augmentation de l'abondance des *Bacteroidetes* observés dans notre modèle animal sous-entend une augmentation dans la proportion de bactéries à Gram-négatif, porteuses de LPS, molécule associée à une inflammation chronique de bas grade chez l'humain [321]. Ce profil bactérien est cohérent avec les données du contenu fécal en AGCC que nous avons obtenues, car comparativement aux contrôles, les niveaux d'AGCC fécaux étaient significativement réduits après les traitements de méthotrexate, principalement chez les souris femelles greffées. Un niveau d'AGCC fécal faible peut contribuer à une augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale, facilitant la translocation d'endotoxines vers la circulation sanguine, comme le LPS sur la surface des bactéries à Gram-négatif, ultimement reliées à des perturbations du métabolisme

des glucides et des lipides [23, 219, 220]. L'étude du microbiote intestinal dans une population d'individus ayant la LLA pédiatrique est relativement récente et peu d'études sont disponibles actuellement. Nonobstant, il a été démontré que, lorsque comparés à des sujets sains, les enfants atteints de la LLA pédiatrique possèdent un profil bactérien significativement différent au diagnostic [248, 249], pendant les traitements [251] et ces changements persistent même après la fin des traitements [253]. Par ailleurs, des doses élevées de méthotrexate ont été associées à une diminution de l'abondance de *Bifidobacteria*, de *Lactobacillus*, et de *Escherichia coli* dans un échantillon de patients ayant la LLA pédiatrique [242]. L'ensemble des données collectées sur la composition et la diversité du microbiote intestinal et de ses métabolites dérivés suggèrent que la dysbiose intestinale ainsi que la réduction du contenu en AGCC fécal chez les femelles sont reliées à des issues métaboliques défavorables. Pour leur part, les mâles présentaient une abondance relative supérieure de la famille de bactéries S24_7 après les traitements versus T0. S24_7 est une famille bactérienne appartenant au phyla des *Bacteroidetes* et son abondance relative a été positivement associée à un mode de vie actif et négativement associée à une diète riche en gras et un mode de vie sédentaire [322]. Ainsi, les mâles ont une flore bactérienne plutôt favorable en plus de présenter des niveaux d'AGCC supérieurs aux contrôles, suggérant un effet protecteur du microbiote intestinal sur les complications métaboliques. Donc, nos données soutiennent l'importance du lien entre la dysbiose intestinale associée au méthotrexate et son impact sur les complications métaboliques et la nécessité d'examiner ce lien plus en détail dans les études cliniques impliquant les survivants de la LLA pédiatrique. De plus, le LPS et les cytokines pro-inflammatoires en circulation, les autres métabolites intestinaux (TMAO, tryptophane, dérivés indoliques), l'expression des jonctions serrées afin d'évaluer la perméabilité intestinale et les voies de signalisation régulées par les AGCC (GPR41, GPR43, HDAC1, HDAC3, GLP-1, PYY) pourraient être mesurés afin de mieux décrire cette relation [323].

L'effet du sexe est un élément très important dans notre étude et constituait un de nos objectifs spécifiques. Effectivement, notre étude a clairement mis en évidence le fait que les souris femelles ont démontré une susceptibilité accrue au développement des complications métaboliques associées à la maladie, et ce de manière plus prononcée lorsqu'elles étaient

soumises au traitement au méthotrexate. Dans les études cliniques, les différences liées au sexe en ce qui concerne les complications cardiométaboliques après un cancer infantile sont bien connues. Par rapport aux survivants masculins, les femmes possèdent une prévalence plus élevée de dyslipidémie [141], un risque plus important de MCV [133], de SM [15] et de cancer secondaire [149]. Les mécanismes par lesquels les femmes sont plus vulnérables restent mal compris, mais une sensibilité accrue à certaines thérapies utilisées dans le traitement de la LLA, comme la RTC ou l'exposition à l'anthracycline et à la doxorubicine ainsi que le dimorphisme sexuel et les différences dans l'expression des certains gènes pourraient y contribuer [15, 157]. Nos résultats proposent également que le méthotrexate est un élément important à considérer dans cette réponse métabolique liée au sexe. De plus, des différences sexuelles par rapport à la composition et la diversité du microbiote intestinal ont été établies dans la littérature. Par exemple, une étude menée en 2019 chez des individus aux prises avec le syndrome métabolique, ont observé que, les femmes présentaient une plus grande proportion fécale des genres *Collinsella*, *Alistipes*, *Anaerotruncus* et *Phascolarctobacterium* que les hommes, et que ceux-ci présentaient plutôt une plus grande abondance des genres *Faecalibacterium* et *Prevotella* [324]. Il a également été soulevé qu'une interaction entre les hormones sexuelles et le microbiote intestinal pourrait jouer un rôle dans les différences de composition et de diversité bactériennes reliées au sexe [325-327]. Les hormones sexuelles, telles que les œstrogènes, ont été associées à la régulation énergétique et au maintien de l'homéostasie glucidique et pourraient potentiellement protéger les femmes contre les dysfonctions métaboliques menant à l'obésité, au SM et au DBT2 [328, 329]. Étant donné que le traitement de la LLA provoque des dysfonctionnements neuroendocriniens, notamment une déficience en hormone de croissance, l'hypothyroïdie et l'hypogonadisme [15, 16, 90], la déficience en hormones sexuelles induite par les traitements pourrait être un mécanisme potentiel à explorer afin d'expliquer cette vulnérabilité des survivantes face aux complications cardiométaboliques. À notre connaissance, le lien entre la dysbiose intestinale et les hormones sexuelles chez les survivants de la LLA n'a pas encore été étudiées.

Chapitre 7 – Forces, limites, perspectives

La principale force de ce projet de recherche est que, par l'utilisation d'un modèle animal, nous avons pu établir une relation de « cause-effet » entre la maladie, le méthotrexate et les paramètres métaboliques mesurés. L'utilisation d'un modèle animal permet également d'évaluer l'effet de la maladie et des traitements sur l'expression protéique dans certains organes, tel que le foie, ainsi que le microbiote intestinal et ses métabolites dérivés, ce qui est impossible dans les études cliniques. Un autre point important est que notre modèle murin xénogénique est «humanisé », c'est-à-dire que les cellules leucémiques humaines ont été injectées pour en étudier son impact *in vivo*. De plus, les blastes choisis provenaient de la lignée pré-B, correspondant au type de leucémie de l'enfant la plus commune. Nos travaux se démarquent aussi par le design de l'étude, permettant de collecter des données sur les effets à court terme et à long terme de la maladie et des traitements. L'utilisation de souris mâles et femelles afin de déterminer l'effet du sexe est une force, puisque les études animales ont fréquemment recours aux mâles seulement. Finalement, à notre connaissance, il s'agit de la première étude visant à évaluer les impacts de la maladie et du méthotrexate sur les paramètres métaboliques, les protéines clés du métabolisme hépatique et du microbiote intestinal et du contenu en AGCC fécal dans un modèle de souris immunodéficiente, ce qui rend nos résultats singuliers et contribue grandement à l'avancement des connaissances.

Toutefois, certaines limites doivent être adressées. Premièrement, nous n'avons pas inclus un groupe de souris recevant seulement le traitement de méthotrexate, sans la greffe de blastes de la LLA, ce qui aurait permis de déterminer l'impact du méthotrexate seul et de le comparer aux autres groupes expérimentaux. De plus, nous n'avions pas de groupe recevant l'ensemble des agents utilisés dans le traitement de la LLA pédiatrique pour des comparaisons supplémentaires. Deuxièmement, une seule souche de blastes provenant d'un patient nouvellement diagnostiqué a été utilisée dans le cadre de cette étude, ce qui n'est pas représentatif de tous les types de LLA pédiatrique. Cependant, le blaste choisi était de type B, représentant la majorité des cas de LLA pédiatrique diagnostiqués. Troisièmement, la recrudescence de la maladie observée pendant la

période de rémission, ce qui pourrait possiblement avoir une incidence sur la distinction des effets causés par la maladie et les traitements sur les issues métaboliques mesurées au sacrifice. Quatrièmement, l'insuline, constituant un élément majeur dans l'interprétation de la résistance à l'insuline et du métabolisme des glucides, n'a pas été dosée dans le cadre de nos travaux. De plus, la mesure de la prise alimentaire aurait pu être effectuée pour s'assurer que ce paramètre ne soit pas un facteur confondant dans notre étude.

Afin d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes, la caractérisation de l'expression protéique de plusieurs autres protéines dans les tissus ainsi que dans l'intestin serait un élément à creuser davantage. Étant donné que nous avons observé les impacts de la maladie et des traitements sur le cholestérol total, les protéines impliquées dans le métabolisme du cholestérol sont à prévoir. De plus, l'expression génique des protéines clés sera effectuée. Dans le même ordre d'idée, le dosage des protéines des jonctions serrées pour déterminer la perméabilité intestinale serait une autre composante intéressante à décrire. L'évaluation d'autres mécanismes complémentaires, tels que l'impact du statut inflammatoire et du SO ainsi que l'impact de l'activité physique sur les variables étudiées serait aussi des avenues pertinentes à explorer. En plus, ce modèle animal permettra de tester d'autres d'agents chimiothérapeutique, tant de manières isolées qu'en combinaison, afin d'évaluer l'impact individuel de chacun et la synergie des agents sur la santé métabolique. Finalement, la répétition du même devis d'étude, sauf avec des souris nourries avec une diète riche en gras et riche en sucre, permettrait d'évaluer la contribution de la diète sur le développement des complications métaboliques.

Chapitre 8 - Conclusion

En conclusion, les données collectées dans le cadre de cette étude suggèrent que la maladie en soi provoque des perturbations du métabolisme des lipides. Le méthotrexate accentue ces impacts délétères en plus d'affecter le métabolisme du glucose. Ces complications métaboliques se sont avérées particulièrement importantes chez les souris femelles. L'étude de protéines clés dans le foie supporte que la maladie est un facteur important dans la dérégulation du métabolisme des lipides. De plus, le méthotrexate pourrait agir via des modifications dans la composition et la diversité du microbiote intestinal associé à une diminution du contenu fécal en AGCC. Des changements dans la régulation de l'expression des protéines du foie, impliquées dans le métabolisme des lipides et des glucides, ainsi que la dysbiose intestinale pourrait expliquer le développement des altérations métaboliques observées chez les femelles. Nos travaux fournissent des données probantes consolidant les hypothèses émises dans la littérature concernant le lien entre les traitements et la dysbiose intestinale, favorisant le développement des désordres cardiométaboliques chez les survivants de cancer pédiatrique, de manière sexe-dépendant. Nos découvertes appuient l'importance de poursuivre la recherche et étudier davantage les mécanismes, dont les voies métaboliques impliquées dans le métabolisme des glucides et des lipides et la dysbiose intestinale induite par les traitements dans cette population. Une meilleure compréhension des facteurs impliqués permettra possible d'identifier des cibles thérapeutiques, qu'elles soient nutritionnelles ou pharmacologiques, afin de réduire les impacts dommageables de la maladie et des traitements sur la santé à long terme des enfants atteints de cancer. Ce lien important à établir pourrait mettre en lumière l'impact des traitements des agents actuellement utilisés dans les traitements de la LLA pédiatrique sur la santé cardiométabolique et sur le microbiote intestinal afin non pas de modifier les protocoles médicamenteux qui ont fait leurs preuves en termes d'efficacité et ayant permis d'augmenter considérablement la survie des patients, mais plutôt de stimuler la recherche sur des thérapies adjuvantes afin de réduire les effets secondaires à court et long-terme sur la santé cardiométabolique de ces individus. Il va sans dire que plusieurs autres facteurs ont une grande influence sur les issues cardiométaboliques, tels que la nutrition et l'activité physique. D'ailleurs,

en plus de la recherche fondamentale axée sur la compréhension des mécanismes contribuant à la progression de ces complications, notre laboratoire participe au projet VIE, évaluant l'impact d'une intervention multidisciplinaire (oncologues, de kinésioles, nutritionnistes, intervenants psychosociaux, physiothérapeutes, ergothérapeutes et travailleurs sociaux) auprès des enfants et adolescents avec un cancer pendant et après leurs traitements afin d'améliorer leur santé à court et long terme.

Références bibliographiques

1. Hutter, J.J., *Childhood leukemia*. *Pediatr Rev*, 2010. **31**(6): p. 234-41.
2. *Centre for Surveillance and Applied Research. Cancer in Young People in Canada Data Tool. 2020 Edition*. Public Health Infobase. Ottawa (ON): Public Health Agency of Canada, 2023.
3. Nirmal, G., et al., *Prevalence and Risk Factors for Metabolic Syndrome Among Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Survivors: Experience From South India*. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2021. **43**(2): p. e154-e158.
4. Levy, E., et al., *Cardiometabolic Risk Factors in Childhood, Adolescent and Young Adult Survivors of Acute Lymphoblastic Leukemia - A Petale Cohort*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 17684.
5. Demedis, J., et al., *Hyperglycemia and Other Glycemic Measures Throughout Therapy for Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia and Lymphoma*. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2023. **45**(2): p. e154-e160.
6. Moschovi, M., et al., *Serum lipid alterations in acute lymphoblastic leukemia of childhood*. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2004. **26**(5): p. 289-93.
7. Louis, C.U. and L. Butani, *High blood pressure and hypertension in children with newly diagnosed acute leukemia and lymphoma*. *Pediatr Nephrol*, 2008. **23**(4): p. 603-9.
8. Warris, L.T., et al., *Acute Activation of Metabolic Syndrome Components in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Treated with Dexamethasone*. *PLoS One*, 2016. **11**(6): p. e0158225.
9. Hijjiya, N. and I.M. van der Sluis, *Asparaginase-associated toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia*. *Leuk Lymphoma*, 2016. **57**(4): p. 748-57.
10. Lowas, S.R., D. Marks, and S. Malempati, *Prevalence of transient hyperglycemia during induction chemotherapy for pediatric acute lymphoblastic leukemia*. *Pediatr Blood Cancer*, 2009. **52**(7): p. 814-8.
11. Oeffinger, K.C., et al., *Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer*. *N Engl J Med*, 2006. **355**(15): p. 1572-82.
12. Moschovi, M., et al., *Serial plasma concentrations of adiponectin, leptin, and resistin during therapy in children with acute lymphoblastic leukemia*. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2010. **32**(1): p. e8-13.
13. Battisti, V., et al., *Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients*. *Clin Biochem*, 2008. **41**(7-8): p. 511-8.
14. Pollock, N.I., et al., *Hyperglycemia during induction therapy for acute lymphoblastic leukemia is temporally linked to pegaspargase administration*. *Pediatr Blood Cancer*, 2022. **69**(7): p. e29505.
15. Gurney, J.G., et al., *Metabolic syndrome and growth hormone deficiency in adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Cancer*, 2006. **107**(6): p. 1303-12.
16. Krull, K.R., et al., *Growth hormone deficiency and neurocognitive function in adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Cancer*, 2019. **125**(10): p. 1748-1755.
17. Chaudhary, P., et al., *Chemotherapy-Induced Oxidative Stress in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia*. *Cureus*, 2023. **15**(3): p. e35968.

18. Saltiel, A.R. and J.M. Olefsky, *Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease*. J Clin Invest, 2017. **127**(1): p. 1-4.
19. Morel, S., et al., *Biomarkers of cardiometabolic complications in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 21507.
20. Mohammad, S. and C. Thiemermann, *Role of Metabolic Endotoxemia in Systemic Inflammation and Potential Interventions*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 594150.
21. Kasai, C., et al., *Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing*. BMC Gastroenterol, 2015. **15**: p. 100.
22. Qin, J., et al., *A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes*. Nature, 2012. **490**(7418): p. 55-60.
23. Guo, Z., et al., *Metabolites of Gut Microbiota and Possible Implication in Development of Diabetes Mellitus*. J Agric Food Chem, 2022. **70**(20): p. 5945-5960.
24. Statistique Canada. *Les principales causes de décès, population totale, selon le groupe d'âge*. 2021; Available from: <https://www150.statcan.gc.ca/t1/tbl1/fr/tv.action?pid=1310039401&pickMembers%5B0%5D=2.21&pickMembers%5B1%5D=3.1&cubeTimeFrame.startYear=2019&cubeTimeFrame.endYear=2019&referencePeriods=20190101%2C20190101>.
25. Research, C.f.S.a.A., *Cancer in Young People in Canada Data Tool*. 2023.
26. Canada, S. *Coup d'oeil sur la santé: Incidence du cancer et mortalité par cancer chez les enfants au Canada*. 2015; Available from: <https://www150.statcan.gc.ca/n1/fr/pub/82-624-x/2015001/article/14213-fra.pdf?st=KitTaZis>.
27. Centre for Surveillance and Applied Research, Public Health Agency of Canada. *Canadian Cancer Data Tool (CCDT), 2021 Edition*. Public Health Infobase. Ottawa (ON): Public Health Agency of Canada, 2021.
28. Canada, S., *Tendances de la survie au cancer chez les enfants au Canada, 1992 à 2017*. 2021.
29. Ward, E., et al., *Childhood and adolescent cancer statistics, 2014*. CA Cancer J Clin, 2014. **64**(2): p. 83-103.
30. Steliarova-Foucher, E., et al., *International incidence of childhood cancer, 2001-10: a population-based registry study*. Lancet Oncol, 2017. **18**(6): p. 719-731.
31. Xie, L., J. Onysko, and H. Morrison, *Childhood cancer incidence in Canada: demographic and geographic variation of temporal trends (1992-2010)*. Health Promot Chronic Dis Prev Can, 2018. **38**(3): p. 79-115.
32. Brown, P., et al., *Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia, Version 2.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology*. J Natl Compr Canc Netw, 2020. **18**(1): p. 81-112.
33. Société de leucémie et lymphome du Canada, *La leucémie lymphoblastique aiguë*. 2017.
34. Malard, F. and M. Mohty, *Acute lymphoblastic leukaemia*. Lancet, 2020. **395**(10230): p. 1146-1162.
35. Liu, C.Y. and C. Li, *Clinical Features and Risk Factors of Severe Pneumonia in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia*. Front Pediatr, 2022. **10**: p. 813638.
36. Grossi, M. and D.M. Green, *Staphylococcus aureus bacteremia in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia*. Oncology, 1983. **40**(5): p. 321-5.

37. Andrade Sabogal, J., et al., *Colorectal fistula and urinary tract infection in a pediatric patient with acute lymphoblastic leukemia*. *Cir Pediatr*, 2021. **34**(4): p. 215-218.
38. Rose-Inman, H. and D. Kuehl, *Acute Leukemia*. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2017. **31**(6): p. 1011-1028.
39. Pécheux, L., et al., [*Bone disorders and complications of pediatric acute lymphoblastic leukemia : monocentric study and review of the literature*]. *Rev Med Liege*, 2018. **73**(11): p. 575-582.
40. Halton, J., et al., *Advanced vertebral fracture among newly diagnosed children with acute lymphoblastic leukemia: results of the Canadian Steroid-Associated Osteoporosis in the Pediatric Population (STOPP) research program*. *J Bone Miner Res*, 2009. **24**(7): p. 1326-34.
41. Krishnamurthy, S., et al., *Facial palsy, an unusual presenting feature of childhood leukemia*. *Pediatr Neurol*, 2002. **27**(1): p. 68-70.
42. Bilavsky, E., et al., *Facial paralysis as a presenting symptom of leukemia*. *Pediatr Neurol*, 2006. **34**(6): p. 502-4.
43. Karimi, M., et al., *Initial presentation of childhood leukaemia with facial palsy: three case reports*. *BMJ Case Rep*, 2009. **2009**.
44. Prada Rico, M., et al., *Renal involvement at diagnosis of pediatric acute lymphoblastic leukemia*. *Pediatr Rep*, 2020. **12**(1): p. 8382.
45. Arora, S.K., et al., *Acute lymphoblastic leukemia presenting as nephromegaly in a child: A rare case report*. *Turk J Pediatr*, 2019. **61**(1): p. 97-101.
46. de Rooij, J.D., C.M. Zwaan, and M. van den Heuvel-Eibrink, *Pediatric AML: From Biology to Clinical Management*. *J Clin Med*, 2015. **4**(1): p. 127-49.
47. Narayanan, D. and O.K. Weinberg, *How I investigate acute myeloid leukemia*. *Int J Lab Hematol*, 2020. **42**(1): p. 3-15.
48. Bhojwani, D., J.J. Yang, and C.H. Pui, *Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Pediatr Clin North Am*, 2015. **62**(1): p. 47-60.
49. Al Gwaiz, L.A. and W. Bassioni, *Immunophenotyping of acute lymphoblastic leukemia using immunohistochemistry in bone marrow biopsy specimens*. *Histol Histopathol*, 2008. **23**(10): p. 1223-8.
50. Gupta, R., et al., *Immunophenotypic characteristics of T lineage acute lymphoblastic leukemia: absence of immaturity markers-TdT, CD34 and HLADR is not uncommon*. *Am J Blood Res*, 2022. **12**(1): p. 1-10.
51. Pui, C.H., F.G. Behm, and W.M. Crist, *Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 1993. **82**(2): p. 343-62.
52. Cocco, N., et al., *Next-Generation Sequencing in Acute Lymphoblastic Leukemia*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(12).
53. Inaba, H. and C.G. Mullighan, *Pediatric acute lymphoblastic leukemia*. *Haematologica*, 2020. **105**(11): p. 2524-2539.
54. Brown, P.A., et al., *Acute Lymphoblastic Leukemia, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology*. *J Natl Compr Canc Netw*, 2021. **19**(9): p. 1079-1109.
55. Fujita, T.C., et al., *Acute lymphoid leukemia etiopathogenesis*. *Mol Biol Rep*, 2021. **48**(1): p. 817-822.

56. Hasaart, K.A.L., et al., *Increased risk of leukaemia in children with Down syndrome: a somatic evolutionary view*. *Expert Rev Mol Med*, 2021. **23**: p. e5.
57. Wegman-Ostrosky, T. and S.A. Savage, *The genomics of inherited bone marrow failure: from mechanism to the clinic*. *Br J Haematol*, 2017. **177**(4): p. 526-542.
58. Roman, E., et al., *Childhood acute lymphoblastic leukaemia and birthweight: insights from a pooled analysis of case-control data from Germany, the United Kingdom and the United States*. *Eur J Cancer*, 2013. **49**(6): p. 1437-47.
59. Groves, F.D., et al., *Birth Weight and Risk of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia in Arizona, Illinois, and Kentucky*. *South Med J*, 2018. **111**(10): p. 579-584.
60. Caughey, R.W. and K.B. Michels, *Birth weight and childhood leukemia: a meta-analysis and review of the current evidence*. *Int J Cancer*, 2009. **124**(11): p. 2658-70.
61. Lupatsch, J.E., et al., *Birth characteristics and childhood leukemia in Switzerland: a register-based case-control study*. *Cancer Causes Control*, 2021. **32**(7): p. 713-723.
62. Rafieemehr, H., et al., *Risk of Acute Lymphoblastic Leukemia: Results of a Case-Control Study*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2019. **20**(8): p. 2477-2483.
63. Onyije, F.M., et al., *Environmental Risk Factors for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: An Umbrella Review*. *Cancers (Basel)*, 2022. **14**(2).
64. Schüz, J. and F. Erdmann, *Environmental Exposure and Risk of Childhood Leukemia: An Overview*. *Arch Med Res*, 2016. **47**(8): p. 607-614.
65. Mahieux, R. and A. Gessain, *Adult T-cell leukemia/lymphoma and HTLV-1*. *Curr Hematol Malig Rep*, 2007. **2**(4): p. 257-64.
66. Graux, C., *Biology of acute lymphoblastic leukemia (ALL): clinical and therapeutic relevance*. *Transfus Apher Sci*, 2011. **44**(2): p. 183-9.
67. Kato, M. and A. Manabe, *Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia*. *Pediatr Int*, 2018. **60**(1): p. 4-12.
68. Vrooman, L.M. and L.B. Silverman, *Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Prognostic Factors and Clinical Advances*. *Curr Hematol Malig Rep*, 2016. **11**(5): p. 385-94.
69. Deak, D., et al., *A narrative review of central nervous system involvement in acute leukemias*. *Ann Transl Med*, 2021. **9**(1): p. 68.
70. Hunger, S.P., et al., *Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group*. *J Clin Oncol*, 2012. **30**(14): p. 1663-9.
71. Nguyen, K., et al., *Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study*. *Leukemia*, 2008. **22**(12): p. 2142-50.
72. Moriyama, T., M.V. Relling, and J.J. Yang, *Inherited genetic variation in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 2015. **125**(26): p. 3988-95.
73. Bhatia, S., et al., *Racial and ethnic differences in survival of children with acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 2002. **100**(6): p. 1957-64.
74. Gupta, S., et al., *Racial and ethnic disparities in childhood and young adult acute lymphocytic leukaemia: secondary analyses of eight Children's Oncology Group cohort trials*. *Lancet Haematol*, 2023. **10**(2): p. e129-e141.

75. Harvey, R.C., et al., *Rearrangement of CRLF2 is associated with mutation of JAK kinases, alteration of IKZF1, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 2010. **115**(26): p. 5312-21.
76. Swinney, R.M., et al., *Polymorphisms in CYP1A1 and ethnic-specific susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in children*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2011. **20**(7): p. 1537-42.
77. Bhatia, S., *Influence of race and socioeconomic status on outcome of children treated for childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Curr Opin Pediatr*, 2004. **16**(1): p. 9-14.
78. Bona, K., et al., *Impact of Socioeconomic Status on Timing of Relapse and Overall Survival for Children Treated on Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocols (2000-2010)*. *Pediatr Blood Cancer*, 2016. **63**(6): p. 1012-8.
79. Saleh, Y., et al., *Anthracycline-induced cardiotoxicity: mechanisms of action, incidence, risk factors, prevention, and treatment*. *Heart Fail Rev*, 2021. **26**(5): p. 1159-1173.
80. Pendleton, M., et al., *Topoisomerase II and leukemia*. *Ann N Y Acad Sci*, 2014. **1310**(1): p. 98-110.
81. Al-Mahayri, Z.N., G.P. Patrinos, and B.R. Ali, *Pharmacogenomics in pediatric acute lymphoblastic leukemia: promises and limitations*. *Pharmacogenomics*, 2017. **18**(7): p. 687-699.
82. Friedman, B. and B. Cronstein, *Mécanisme d'action du méthotrexate dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde*. *Rev Rhum Ed Fr*, 2020. **87**(2): p. 92-98.
83. Lansiaux, A., *[Antimetabolites]*. *Bull Cancer*, 2011. **98**(11): p. 1263-74.
84. Hall, A.G. and M.J. Tilby, *Mechanisms of action of, and modes of resistance to, alkylating agents used in the treatment of haematological malignancies*. *Blood Rev*, 1992. **6**(3): p. 163-73.
85. Barnes, P.J., *Corticosteroid effects on cell signalling*. *Eur Respir J*, 2006. **27**(2): p. 413-26.
86. Inaba, H. and C.H. Pui, *Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukaemia*. *Lancet Oncol*, 2010. **11**(11): p. 1096-106.
87. Waber, D.P., et al., *Neuropsychological outcomes from a randomized trial of triple intrathecal chemotherapy compared with 18 Gy cranial radiation as CNS treatment in acute lymphoblastic leukemia: findings from Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 95-01*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(31): p. 4914-21.
88. Yeh, T.C., et al., *Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia with delayed first intrathecal therapy and omission of prophylactic cranial irradiation: Results of the TPOG-ALL-2002 study*. *Cancer*, 2018. **124**(23): p. 4538-4547.
89. Hijiya, N., et al., *Cumulative incidence of secondary neoplasms as a first event after childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Jama*, 2007. **297**(11): p. 1207-15.
90. Follin, C. and E.M. Erfurth, *Long-Term Effect of Cranial Radiotherapy on Pituitary-Hypothalamus Area in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Survivors*. *Curr Treat Options Oncol*, 2016. **17**(9): p. 50.
91. Phillips, N.S., et al., *Cerebral microbleeds in adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia treated with cranial radiation*. *Sci Rep*, 2020. **10**(1): p. 692.
92. Pui, C.H., et al., *Extended follow-up of long-term survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia*. *N Engl J Med*, 2003. **349**(7): p. 640-9.

93. Chang, J.H., et al., *Acute lymphoblastic leukemia*. *Pediatr Blood Cancer*, 2021. **68 Suppl 2**: p. e28371.
94. Thastrup, M., et al., *Central nervous system involvement in childhood acute lymphoblastic leukemia: challenges and solutions*. *Leukemia*, 2022. **36**(12): p. 2751-2768.
95. Goebeler, M.E. and R. Bargou, *Blinatumomab: a CD19/CD3 bispecific T cell engager (BiTE) with unique anti-tumor efficacy*. *Leuk Lymphoma*, 2016. **57**(5): p. 1021-32.
96. Inaba, H. and C.H. Pui, *Immunotherapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia*. *Cancer Metastasis Rev*, 2019. **38**(4): p. 595-610.
97. Quintás-Cardama, A. and J. Cortes, *Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia*. *Blood*, 2009. **113**(8): p. 1619-30.
98. Mathisen, M.S., et al., *Role of tyrosine kinase inhibitors in the management of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia*. *Curr Hematol Malig Rep*, 2011. **6**(3): p. 187-94.
99. Merli, P., et al., *Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia*. *Curr Hematol Malig Rep*, 2019. **14**(2): p. 94-105.
100. Wolf, J., et al., *Levofloxacin Prophylaxis During Induction Therapy for Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia*. *Clin Infect Dis*, 2017. **65**(11): p. 1790-1798.
101. Zonfrillo, M.R., *Management of pediatric tumor lysis syndrome in the emergency department*. *Emerg Med Clin North Am*, 2009. **27**(3): p. 497-504.
102. Kumar, R., et al., *Defining kidney outcomes in children with acute lymphoblastic leukemia in the modern era*. *Pediatr Nephrol*, 2022. **37**(9): p. 2119-2126.
103. Mogensen, P.R., et al., *Dyslipidemia at diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia*. *PLoS One*, 2020. **15**(4): p. e0231209.
104. Halton, J.M., et al., *Blood lipid profiles in children with acute lymphoblastic leukemia*. *Cancer*, 1998. **83**(2): p. 379-84.
105. Usman, H., et al., *Revisiting the dyslipidemia associated with acute leukemia*. *Clin Chim Acta*, 2015. **444**: p. 43-9.
106. Esbenshade, A.J., et al., *Obesity and insulin resistance in pediatric acute lymphoblastic leukemia worsens during maintenance therapy*. *Pediatr Blood Cancer*, 2013. **60**(8): p. 1287-91.
107. Belle, F.N., et al., *Overweight in childhood cancer patients at diagnosis and throughout therapy: A multicentre cohort study*. *Clin Nutr*, 2019. **38**(2): p. 835-841.
108. Gelelete, C.B., et al., *Overweight as a prognostic factor in children with acute lymphoblastic leukemia*. *Obesity (Silver Spring)*, 2011. **19**(9): p. 1908-11.
109. Butturini, A.M., et al., *Obesity and outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(15): p. 2063-9.
110. Love, E., et al., *A cross-sectional study of overweight in pediatric survivors of acute lymphoblastic leukemia (ALL)*. *Pediatr Blood Cancer*, 2011. **57**(7): p. 1204-9.
111. Karakurt, H., et al., *Screening survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia for obesity, metabolic syndrome, and insulin resistance*. *Pediatr Hematol Oncol*, 2012. **29**(6): p. 551-61.
112. Öztürk, A.P., B. Koç, and B. Zülfikar, *Acute Complications and Survival Analysis of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A 15-year Experience*. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2021. **21**(1): p. e39-e47.

113. Schmiegelow, K., et al., *Consensus definitions of 14 severe acute toxic effects for childhood lymphoblastic leukaemia treatment: a Delphi consensus*. *Lancet Oncol*, 2016. **17**(6): p. e231-e239.
114. Schündeln, M.M., et al., *Prevalence of Osteopathologies in Children and Adolescents After Diagnosis of Acute Lymphoblastic Leukemia*. *Front Pediatr*, 2020. **8**: p. 509.
115. De Pietri, S., et al., *Gastrointestinal toxicity during induction treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia: The impact of the gut microbiota*. *Int J Cancer*, 2020. **147**(7): p. 1953-1962.
116. Maddheshiya, S., et al., *Bone Mineral Metabolism During Chemotherapy in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia*. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2021. **43**(5): p. 172-175.
117. Mostoufi-Moab, S. and L.M. Ward, *Skeletal Morbidity in Children and Adolescents during and following Cancer Therapy*. *Horm Res Paediatr*, 2019. **91**(2): p. 137-151.
118. Śliwa-Tytko, P., et al., *Neurotoxicity Associated with Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia Chemotherapy and Immunotherapy*. *Int J Mol Sci*, 2022. **23**(10).
119. Kourtis, M., et al., *Metabolic syndrome in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia after the completion of chemotherapy*. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2005. **27**(9): p. 499-501.
120. Esbenshade, A.J., et al., *Body mass index and blood pressure changes over the course of treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia*. *Pediatr Blood Cancer*, 2011. **56**(3): p. 372-8.
121. Odame, I., et al., *Patterns of obesity in boys and girls after treatment for acute lymphoblastic leukaemia*. *Arch Dis Child*, 1994. **71**(2): p. 147-9.
122. Didi, M., et al., *High incidence of obesity in young adults after treatment of acute lymphoblastic leukemia in childhood*. *J Pediatr*, 1995. **127**(1): p. 63-7.
123. Malhotra, P., et al., *Incidence and Risk Factors for Hypertension During Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Therapy*. *Indian Pediatr*, 2018. **55**(10): p. 877-879.
124. Giordano, P., et al., *Endothelial dysfunction and cardiovascular risk factors in childhood acute lymphoblastic leukemia survivors*. *Int J Cardiol*, 2017. **228**: p. 621-627.
125. Cohen, H., et al., *Conservative treatment of L-asparaginase-associated lipid abnormalities in children with acute lymphoblastic leukemia*. *Pediatr Blood Cancer*, 2010. **54**(5): p. 703-6.
126. Parsons, S.K., et al., *Asparaginase-associated lipid abnormalities in children with acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 1997. **89**(6): p. 1886-95.
127. Handattu, K., et al., *Drug Induced Diabetes Mellitus in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: Approach to Diagnosis and Management*. 2022. **44**(6): p. 273-279.
128. McCormick, M.C., et al., *Hyperglycemia requiring insulin during acute lymphoblastic leukemia induction chemotherapy is associated with increased adverse outcomes and healthcare costs*. *Pediatr Blood Cancer*, 2020. **67**(9): p. e28475.
129. Baillargeon, J., et al., *Transient hyperglycemia in Hispanic children with acute lymphoblastic leukemia*. *Pediatr Blood Cancer*, 2005. **45**(7): p. 960-3.
130. Laila, R., A. Islam, and M.M. Bhuiyan, *Incidence of Hyperglycemia during Induction of Remission Phase of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia*. *Mymensingh Med J*, 2016. **25**(4): p. 730-735.

131. Lowas, S., S. Malempati, and D. Marks, *Body mass index predicts insulin resistance in survivors of pediatric acute lymphoblastic leukemia*. *Pediatr Blood Cancer*, 2009. **53**(1): p. 58-63.
132. Mody, R., et al., *Twenty-five-year follow-up among survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Childhood Cancer Survivor Study*. *Blood*, 2008. **111**(12): p. 5515-23.
133. Mulrooney, D.A., et al., *Cardiac outcomes in a cohort of adult survivors of childhood and adolescent cancer: retrospective analysis of the Childhood Cancer Survivor Study cohort*. *Bmj*, 2009. **339**: p. b4606.
134. Oeffinger, K.C., et al., *Cardiovascular risk factors in young adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia*. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2001. **23**(7): p. 424-30.
135. Meacham, L.R., et al., *Cardiovascular risk factors in adult survivors of pediatric cancer--a report from the childhood cancer survivor study*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010. **19**(1): p. 170-81.
136. Ariffin, H., et al., *Young adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia show evidence of chronic inflammation and cellular aging*. *Cancer*, 2017. **123**(21): p. 4207-4214.
137. Bérard, S., et al., *Diet Quality Is Associated with Cardiometabolic Outcomes in Survivors of Childhood Leukemia*. *Nutrients*, 2020. **12**(7).
138. Steinberger, J., et al., *Cardiovascular risk and insulin resistance in childhood cancer survivors*. *J Pediatr*, 2012. **160**(3): p. 494-9.
139. Azanan, M.S., et al., *Immunity in young adult survivors of childhood leukemia is similar to the elderly rather than age-matched controls: Role of cytomegalovirus*. *Eur J Immunol*, 2016. **46**(7): p. 1715-26.
140. Link, K., et al., *Growth hormone deficiency predicts cardiovascular risk in young adults treated for acute lymphoblastic leukemia in childhood*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(10): p. 5003-12.
141. Morel, S., et al., *Lipid and lipoprotein abnormalities in acute lymphoblastic leukemia survivors*. *J Lipid Res*, 2017. **58**(5): p. 982-993.
142. Lipshultz, S.E., et al., *Cardiovascular status of childhood cancer survivors exposed and unexposed to cardiotoxic therapy*. *J Clin Oncol*, 2012. **30**(10): p. 1050-7.
143. Williams, H.E., et al., *Diabetes mellitus among adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia: A report from the St. Jude Lifetime Cohort Study*. *Cancer*, 2020. **126**(4): p. 870-878.
144. Bülow, B., et al., *Survivors of childhood acute lymphoblastic leukaemia, with radiation-induced GH deficiency, exhibit hyperleptinaemia and impaired insulin sensitivity, unaffected by 12 months of GH treatment*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2004. **61**(6): p. 683-91.
145. Karakaya, P., et al., *Endocrinological and cardiological late effects among survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Turk J Haematol*, 2013. **30**(3): p. 290-9.
146. Kimball Dalton, V.M., et al., *Second malignancies in patients treated for childhood acute lymphoblastic leukemia*. *J Clin Oncol*, 1998. **16**(8): p. 2848-53.
147. Pui, C.H., et al., *Risk of adverse events after completion of therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(31): p. 7936-41.
148. Perkins, S.M., et al., *Risk of subsequent malignancies in survivors of childhood leukemia*. *J Cancer Surviv*, 2013. **7**(4): p. 544-50.

149. Friedman, D.L., et al., *Subsequent neoplasms in 5-year survivors of childhood cancer: the Childhood Cancer Survivor Study*. J Natl Cancer Inst, 2010. **102**(14): p. 1083-95.
150. Schmiegelow, K., et al., *Second malignant neoplasms after treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia*. J Clin Oncol, 2013. **31**(19): p. 2469-76.
151. Neglia, J.P., et al., *Second malignant neoplasms in five-year survivors of childhood cancer: childhood cancer survivor study*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(8): p. 618-29.
152. Kaste, S.C., et al., *Bone mineral decrements in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia: frequency of occurrence and risk factors for their development*. Leukemia, 2001. **15**(5): p. 728-34.
153. Vitanza, N.A., et al., *The Progression of Bone Mineral Density Abnormalities After Chemotherapy for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia*. J Pediatr Hematol Oncol, 2015. **37**(5): p. 356-61.
154. Rohani, F., et al., *Bone Mineral Density in Survivors of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia*. Asian Pac J Cancer Prev, 2017. **18**(2): p. 535-540.
155. Guren Dolu, M., et al., *Bone mineralization defects after treatment of acute lymphoblastic leukemia in children*. Minerva Pediatr, 2015. **67**(5): p. 419-25.
156. Kadan-Lottick, N.S., et al., *Osteonecrosis in adult survivors of childhood cancer: a report from the childhood cancer survivor study*. J Clin Oncol, 2008. **26**(18): p. 3038-45.
157. Armstrong, G.T., et al., *Long-term health status among survivors of childhood cancer: does sex matter?* J Clin Oncol, 2007. **25**(28): p. 4477-89.
158. Cheung, Y.T., et al., *Chronic Health Conditions and Neurocognitive Function in Aging Survivors of Childhood Cancer: A Report from the Childhood Cancer Survivor Study*. J Natl Cancer Inst, 2018. **110**(4): p. 411-419.
159. Krull, K.R., et al., *Neurocognitive outcomes decades after treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the St Jude lifetime cohort study*. J Clin Oncol, 2013. **31**(35): p. 4407-15.
160. van der Plas, E., et al., *Sex-Specific Associations Between Chemotherapy, Chronic Conditions, and Neurocognitive Impairment in Acute Lymphoblastic Leukemia Survivors: A Report From the Childhood Cancer Survivor Study*. J Natl Cancer Inst, 2021. **113**(5): p. 588-596.
161. Garmey, E.G., et al., *Longitudinal changes in obesity and body mass index among adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Childhood Cancer Survivor Study*. J Clin Oncol, 2008. **26**(28): p. 4639-45.
162. Armstrong, G.T., et al., *Late mortality among 5-year survivors of childhood cancer: a summary from the Childhood Cancer Survivor Study*. J Clin Oncol, 2009. **27**(14): p. 2328-38.
163. Malhotra, P., et al., *Obesity and Sarcopenia in Survivors of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia*. Indian Pediatr, 2021. **58**(5): p. 436-440.
164. Juan, C.A., et al., *The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(9).
165. Demirci-Çekiç, S., et al., *Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense*. J Pharm Biomed Anal, 2022. **209**: p. 114477.

166. Furman, D., et al., *Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span*. Nat Med, 2019. **25**(12): p. 1822-1832.
167. Liguori, I., et al., *Oxidative stress, aging, and diseases*. Clin Interv Aging, 2018. **13**: p. 757-772.
168. Guzik, T.J. and R.M. Touyz, *Oxidative Stress, Inflammation, and Vascular Aging in Hypertension*. Hypertension, 2017. **70**(4): p. 660-667.
169. Sitia, S., et al., *From endothelial dysfunction to atherosclerosis*. Autoimmun Rev, 2010. **9**(12): p. 830-4.
170. Roy, J., et al., *Physiological role of reactive oxygen species as promoters of natural defenses*. Faseb j, 2017. **31**(9): p. 3729-3745.
171. Petrie, J.R., T.J. Guzik, and R.M. Touyz, *Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease: Clinical Insights and Vascular Mechanisms*. Can J Cardiol, 2018. **34**(5): p. 575-584.
172. Goldin, A., et al., *Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury*. Circulation, 2006. **114**(6): p. 597-605.
173. Khatana, C., et al., *Mechanistic Insights into the Oxidized Low-Density Lipoprotein-Induced Atherosclerosis*. Oxid Med Cell Longev, 2020. **2020**: p. 5245308.
174. Falk, E., *Pathogenesis of atherosclerosis*. J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(8 Suppl): p. C7-12.
175. Koba, S., et al., *Small LDL-cholesterol is superior to LDL-cholesterol for determining severe coronary atherosclerosis*. J Atheroscler Thromb, 2008. **15**(5): p. 250-60.
176. St-Pierre, A.C., et al., *Low-density lipoprotein subfractions and the long-term risk of ischemic heart disease in men: 13-year follow-up data from the Québec Cardiovascular Study*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(3): p. 553-9.
177. Griffin, B.A., *Lipoprotein atherogenicity: an overview of current mechanisms*. Proc Nutr Soc, 1999. **58**(1): p. 163-9.
178. Berneis, K.K. and R.M. Krauss, *Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity*. J Lipid Res, 2002. **43**(9): p. 1363-79.
179. Batty, M., M.R. Bennett, and E. Yu, *The Role of Oxidative Stress in Atherosclerosis*. Cells, 2022. **11**(23).
180. Moore, K.J. and I. Tabas, *Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis*. Cell, 2011. **145**(3): p. 341-55.
181. Hansson, G.K., *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. N Engl J Med, 2005. **352**(16): p. 1685-95.
182. Kawai, T., M.V. Autieri, and R. Scalia, *Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity*. Am J Physiol Cell Physiol, 2021. **320**(3): p. C375-c391.
183. Reddy, P., et al., *Metabolic syndrome is an inflammatory disorder: A conspiracy between adipose tissue and phagocytes*. Clin Chim Acta, 2019. **496**: p. 35-44.
184. Esser, N., et al., *Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes*. Diabetes Res Clin Pract, 2014. **105**(2): p. 141-50.
185. Barchetta, I., et al., *Sick fat: the good and the bad of old and new circulating markers of adipose tissue inflammation*. J Endocrinol Invest, 2019. **42**(11): p. 1257-1272.
186. Sentürk, S., et al., *Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme levels in childhood acute lymphoblastic leukemia*. FEBS Lett, 1997. **416**(3): p. 286-90.
187. Roxburgh, C.S. and D.C. McMillan, *Cancer and systemic inflammation: treat the tumour and treat the host*. Br J Cancer, 2014. **110**(6): p. 1409-12.

188. Tuomisto, A.E., M.J. Mäkinen, and J.P. Väyrynen, *Systemic inflammation in colorectal cancer: Underlying factors, effects, and prognostic significance*. World J Gastroenterol, 2019. **25**(31): p. 4383-4404.
189. Ouchi, N., et al., *Adipokines in inflammation and metabolic disease*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(2): p. 85-97.
190. Hotamisligil, G.S., *Inflammation and metabolic disorders*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 860-7.
191. Hong, N., et al., *The relationship between dyslipidemia and inflammation among adults in east coast China: A cross-sectional study*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 937201.
192. Brieger, K., et al., *Reactive oxygen species: from health to disease*. Swiss Med Wkly, 2012. **142**: p. w13659.
193. Borrego-Soto, G., R. Ortiz-López, and A. Rojas-Martínez, *Ionizing radiation-induced DNA injury and damage detection in patients with breast cancer*. Genet Mol Biol, 2015. **38**(4): p. 420-32.
194. Pezone, A., et al., *Inflammation and DNA damage: cause, effect or both*. Nat Rev Rheumatol, 2023. **19**(4): p. 200-211.
195. Dodig, S., I. Čepelak, and I. Pavić, *Hallmarks of senescence and aging*. Biochem Med (Zagreb), 2019. **29**(3): p. 030501.
196. Aluise, C.D., et al., *2-Mercaptoethane sulfonate prevents doxorubicin-induced plasma protein oxidation and TNF- α release: implications for the reactive oxygen species-mediated mechanisms of chemobrain*. Free Radic Biol Med, 2011. **50**(11): p. 1630-8.
197. Toro-Salazar, O.H., et al., *Use of integrated imaging and serum biomarker profiles to identify subclinical dysfunction in pediatric cancer patients treated with anthracyclines*. Cardiooncology, 2018. **4**.
198. Adams, M.J., et al., *Radiation-associated cardiovascular disease: manifestations and management*. Semin Radiat Oncol, 2003. **13**(3): p. 346-56.
199. Howard, S.C. and C.H. Pui, *Endocrine complications in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia*. Blood Rev, 2002. **16**(4): p. 225-43.
200. Brignardello, E., et al., *Endocrine health conditions in adult survivors of childhood cancer: the need for specialized adult-focused follow-up clinics*. Eur J Endocrinol, 2013. **168**(3): p. 465-72.
201. F, D.E.F., et al., *Treatment Complications and Long-term Outcomes of Total Body Irradiation in Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia: A Single Institute Experience*. Anticancer Res, 2016. **36**(9): p. 4859-64.
202. Ekedahl, H., et al., *Low-grade inflammation in survivors of childhood cancer and testicular cancer and its association with hypogonadism and metabolic risk factors*. BMC Cancer, 2022. **22**(1): p. 157.
203. Mulder, R.L., et al., *Prevalence and risk factors of radiation-induced growth hormone deficiency in childhood cancer survivors: a systematic review*. Cancer Treat Rev, 2009. **35**(7): p. 616-32.
204. Su, X., et al., *Hyperlipidemia and hypothyroidism*. Clin Chim Acta, 2022. **527**: p. 61-70.
205. Bélanger, V., et al., *Abnormal HDL lipid and protein composition following pediatric cancer treatment: an associative study*. Lipids Health Dis, 2023. **22**(1): p. 72.

206. Swain, S.M., F.S. Whaley, and M.S. Ewer, *Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials*. *Cancer*, 2003. **97**(11): p. 2869-79.
207. Chan, J.C., C.S. Cockram, and J.A. Critchley, *Drug-induced disorders of glucose metabolism. Mechanisms and management*. *Drug Saf*, 1996. **15**(2): p. 135-57.
208. Bhojwani, D., et al., *Severe hypertriglyceridaemia during therapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia*. *Eur J Cancer*, 2014. **50**(15): p. 2685-94.
209. Mazur, B., et al., *Concentration of IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-alpha in children with acute lymphoblastic leukemia after cessation of chemotherapy*. *Hematol Oncol*, 2004. **22**(1): p. 27-34.
210. Sadurska, E., et al., *Premature atherosclerosis after treatment for acute lymphoblastic leukemia in childhood*. *Ann Agric Environ Med*, 2018. **25**(1): p. 71-76.
211. Kordinas, V., A. Ioannidis, and S. Chatzipanagiotou, *The Telomere/Telomerase System in Chronic Inflammatory Diseases. Cause or Effect?* *Genes (Basel)*, 2016. **7**(9).
212. Dutta, D. and S.H. Lim, *Bidirectional interaction between intestinal microbiome and cancer: opportunities for therapeutic interventions*. *Biomark Res*, 2020. **8**: p. 31.
213. Dabke, K., G. Hendrick, and S. Devkota, *The gut microbiome and metabolic syndrome*. *J Clin Invest*, 2019. **129**(10): p. 4050-4057.
214. Andermann, T., et al., *Estimating Alpha, Beta, and Gamma Diversity Through Deep Learning*. *Front Plant Sci*, 2022. **13**: p. 839407.
215. Geng, J., et al., *The links between gut microbiota and obesity and obesity related diseases*. *Biomed Pharmacother*, 2022. **147**: p. 112678.
216. Fusco, W., et al., *Short-Chain Fatty-Acid-Producing Bacteria: Key Components of the Human Gut Microbiota*. *Nutrients*, 2023. **15**(9).
217. Akhtar, M., et al., *Gut microbiota-derived short chain fatty acids are potential mediators in gut inflammation*. *Anim Nutr*, 2022. **8**: p. 350-360.
218. Nogal, A., A.M. Valdes, and C. Menni, *The role of short-chain fatty acids in the interplay between gut microbiota and diet in cardio-metabolic health*. *Gut Microbes*, 2021. **13**(1): p. 1-24.
219. Portincasa, P., et al., *Gut Microbiota and Short Chain Fatty Acids: Implications in Glucose Homeostasis*. *Int J Mol Sci*, 2022. **23**(3).
220. Saad, M.J., A. Santos, and P.O. Prada, *Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance*. *Physiology (Bethesda)*, 2016. **31**(4): p. 283-93.
221. Morrison, D.J. and T. Preston, *Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism*. *Gut Microbes*, 2016. **7**(3): p. 189-200.
222. Hamer, H.M., et al., *Review article: the role of butyrate on colonic function*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2008. **27**(2): p. 104-19.
223. Otani, T. and M. Furuse, *Tight Junction Structure and Function Revisited*. *Trends Cell Biol*, 2020. **30**(10): p. 805-817.
224. Kuo, W.T., et al., *Tight junction proteins occludin and ZO-1 as regulators of epithelial proliferation and survival*. *Ann N Y Acad Sci*, 2022. **1514**(1): p. 21-33.
225. Mohr, A.E., et al., *Lipopolysaccharide and the gut microbiota: considering structural variation*. *FEBS Lett*, 2022. **596**(7): p. 849-875.
226. Sul, O.J. and S.W. Ra, *Quercetin Prevents LPS-Induced Oxidative Stress and Inflammation by Modulating NOX2/ROS/NF-kB in Lung Epithelial Cells*. *Molecules*, 2021. **26**(22).

227. Di Tommaso, N., A. Gasbarrini, and F.R. Ponziani, *Intestinal Barrier in Human Health and Disease*. Int J Environ Res Public Health, 2021. **18**(23).
228. Miller, M.A., et al., *Ethnic and sex differences in circulating endotoxin levels: A novel marker of atherosclerotic and cardiovascular risk in a British multi-ethnic population*. Atherosclerosis, 2009. **203**(2): p. 494-502.
229. Bervoets, L., et al., *Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: a cross-sectional study*. Gut Pathog, 2013. **5**(1): p. 10.
230. Gurung, M., et al., *Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology*. EBioMedicine, 2020. **51**: p. 102590.
231. Larsen, N., et al., *Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9085.
232. Vinolo, M.A., et al., *Regulation of inflammation by short chain fatty acids*. Nutrients, 2011. **3**(10): p. 858-76.
233. Oldenburg, M., et al., *The Microbiome in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia*. Cancers (Basel), 2021. **13**(19).
234. van Vliet, M.J., et al., *Chemotherapy treatment in pediatric patients with acute myeloid leukemia receiving antimicrobial prophylaxis leads to a relative increase of colonization with potentially pathogenic bacteria in the gut*. Clin Infect Dis, 2009. **49**(2): p. 262-70.
235. Nam, Y.D., et al., *Impact of pelvic radiotherapy on gut microbiota of gynecological cancer patients revealed by massive pyrosequencing*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e82659.
236. Montassier, E., et al., *16S rRNA gene pyrosequencing reveals shift in patient faecal microbiota during high-dose chemotherapy as conditioning regimen for bone marrow transplantation*. Microb Ecol, 2014. **67**(3): p. 690-9.
237. Wang, W., H. Zhou, and L. Liu, *Side effects of methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: A systematic review*. Eur J Med Chem, 2018. **158**: p. 502-516.
238. Howard, S.C., et al., *Preventing and Managing Toxicities of High-Dose Methotrexate*. Oncologist, 2016. **21**(12): p. 1471-1482.
239. Arslan, A., et al., *Effects of nimesulide on the small intestine mucositis induced by methotrexate in rats*. Exp Anim, 2016. **65**(4): p. 329-336.
240. Fijlstra, M., et al., *Substantial decreases in the number and diversity of microbiota during chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis in a rat model*. Support Care Cancer, 2015. **23**(6): p. 1513-22.
241. Beutheu Youmba, S., et al., *Methotrexate modulates tight junctions through NF- κ B, MEK, and JNK pathways*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2012. **54**(4): p. 463-70.
242. Huang, Y., et al., *Effect of high-dose methotrexate chemotherapy on intestinal Bifidobacteria, Lactobacillus and Escherichia coli in children with acute lymphoblastic leukemia*. Exp Biol Med (Maywood), 2012. **237**(3): p. 305-11.
243. Chaput, N., et al., *Baseline gut microbiota predicts clinical response and colitis in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab*. Ann Oncol, 2017. **28**(6): p. 1368-1379.
244. Villéger, R., et al., *Intestinal Microbiota: A Novel Target to Improve Anti-Tumor Treatment?* Int J Mol Sci, 2019. **20**(18).

245. Hakim, H., et al., *Gut Microbiome Composition Predicts Infection Risk During Chemotherapy in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia*. Clin Infect Dis, 2018. **67**(4): p. 541-548.
246. Nearing, J.T., et al., *Infectious Complications Are Associated With Alterations in the Gut Microbiome in Pediatric Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia*. Front Cell Infect Microbiol, 2019. **9**: p. 28.
247. Taur, Y., et al., *The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Blood, 2014. **124**(7): p. 1174-82.
248. Bai, L., et al., *Changes in the gastrointestinal microbiota of children with acute lymphoblastic leukaemia and its association with antibiotics in the short term*. J Med Microbiol, 2017. **66**(9): p. 1297-1307.
249. Rajagopala, S.V., et al., *Gastrointestinal microbial populations can distinguish pediatric and adolescent Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) at the time of disease diagnosis*. BMC Genomics, 2016. **17**(1): p. 635.
250. Rajagopala, S.V., et al., *Persistent Gut Microbial Dysbiosis in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) During Chemotherapy*. Microb Ecol, 2020. **79**(4): p. 1034-1043.
251. Chua, L.L., et al., *Temporal changes in gut microbiota profile in children with acute lymphoblastic leukemia prior to commencement-, during-, and post-cessation of chemotherapy*. BMC Cancer, 2020. **20**(1): p. 151.
252. Thomas, R., et al., *Gut microbial composition difference between pediatric ALL survivors and siblings*. Pediatr Hematol Oncol, 2020. **37**(6): p. 475-488.
253. Chua, L.L., et al., *Reduced microbial diversity in adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia and microbial associations with increased immune activation*. Microbiome, 2017. **5**(1): p. 35.
254. Miquel, S., et al., *Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health*. Curr Opin Microbiol, 2013. **16**(3): p. 255-61.
255. Petersen, K.S. and P.M. Kris-Etherton, *Diet Quality Assessment and the Relationship between Diet Quality and Cardiovascular Disease Risk*. Nutrients, 2021. **13**(12).
256. Bellou, V., et al., *Risk factors for type 2 diabetes mellitus: An exposure-wide umbrella review of meta-analyses*. PLoS One, 2018. **13**(3): p. e0194127.
257. Schröder, H., M. Fito, and M.I. Covas, *Association of fast food consumption with energy intake, diet quality, body mass index and the risk of obesity in a representative Mediterranean population*. Br J Nutr, 2007. **98**(6): p. 1274-80.
258. Berdan, C.A., et al., *Childhood cancer survivors and adherence to the American Cancer Society Guidelines on Nutrition and Physical Activity*. J Cancer Surviv, 2014. **8**(4): p. 671-9.
259. Robien, K., et al., *Poor adherence to dietary guidelines among adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia*. J Pediatr Hematol Oncol, 2008. **30**(11): p. 815-22.
260. Zhang, F.F., et al., *Comparison of childhood cancer survivors' nutritional intake with US dietary guidelines*. Pediatr Blood Cancer, 2015. **62**(8): p. 1461-7.
261. Murphy-Alford, A.J., et al., *Body composition, dietary intake and physical activity of young survivors of childhood cancer*. Clin Nutr, 2019. **38**(2): p. 842-847.
262. Fleming, C.A.K., et al., *Poor diet quality and adverse eating behaviors in young survivors of childhood cancer*. Pediatr Blood Cancer, 2022. **69**(1): p. e29408.

263. Cohen, J., et al., *Taste and smell dysfunction in childhood cancer survivors*. *Appetite*, 2014. **75**: p. 135-40.
264. Kershaw, J.C. and R.D. Mattes, *Nutrition and taste and smell dysfunction*. *World J Otorhinolaryngol Head Neck Surg*, 2018. **4**(1): p. 3-10.
265. van den Brink, M., et al., *The impact of changes in taste, smell, and eating behavior in children with cancer undergoing chemotherapy: A qualitative study*. *Front Nutr*, 2022. **9**: p. 984101.
266. Chardon, M.L., et al., *Eating behaviors and dietary quality in childhood acute lymphoblastic leukemia survivors*. *Pediatr Blood Cancer*, 2021. **68**(4): p. e28811.
267. Chen, P.J. and M. Antonelli, *Conceptual Models of Food Choice: Influential Factors Related to Foods, Individual Differences, and Society*. *Foods*, 2020. **9**(12).
268. Belle, F.N., et al., *Dietary Intake and Diet Quality of Adult Survivors of Childhood Cancer and the General Population: Results from the SCCSS-Nutrition Study*. *Nutrients*, 2021. **13**(6).
269. Tonorezos, E.S., et al., *Contribution of diet and physical activity to metabolic parameters among survivors of childhood leukemia*. *Cancer Causes Control*, 2013. **24**(2): p. 313-21.
270. Ito, M., et al., *NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells*. *Blood*, 2002. **100**(9): p. 3175-82.
271. Carreno, B.M., et al., *Immunodeficient mouse strains display marked variability in growth of human melanoma lung metastases*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(10): p. 3277-86.
272. Agliano, A., et al., *Human acute leukemia cells injected in NOD/LtSz-scid/IL-2Rgamma null mice generate a faster and more efficient disease compared to other NOD/scid-related strains*. *Int J Cancer*, 2008. **123**(9): p. 2222-7.
273. Suemizu, H., et al., *Identification of a key molecular regulator of liver metastasis in human pancreatic carcinoma using a novel quantitative model of metastasis in NOD/SCID/gammacnull (NOG) mice*. *Int J Oncol*, 2007. **31**(4): p. 741-51.
274. Machida, K., et al., *Higher susceptibility of NOG mice to xenotransplanted tumors*. *J Toxicol Sci*, 2009. **34**(1): p. 123-7.
275. Kanaji, N., et al., *Higher susceptibility of NOD/LtSz-scid Il2rg (-/-) NSG mice to xenotransplanted lung cancer cell lines*. *Cancer Manag Res*, 2014. **6**: p. 431-6.
276. Wege, A.K., et al., *Humanized tumor mice--a new model to study and manipulate the immune response in advanced cancer therapy*. *Int J Cancer*, 2011. **129**(9): p. 2194-206.
277. Sartelet, H., et al., *Description of a new xenograft model of metastatic neuroblastoma using NOD/SCID/Il2rg null (NSG) mice*. *In Vivo*, 2012. **26**(1): p. 19-29.
278. Zhou, Q., et al., *Humanized NOD-SCID IL2rg-/- mice as a preclinical model for cancer research and its potential use for individualized cancer therapies*. *Cancer Lett*, 2014. **344**(1): p. 13-19.
279. Shultz, L.D., et al., *Human cancer growth and therapy in immunodeficient mouse models*. *Cold Spring Harb Protoc*, 2014. **2014**(7): p. 694-708.
280. von Kalle, C., et al., *Growth of Hodgkin cell lines in severely combined immunodeficient mice*. *Int J Cancer*, 1992. **52**(6): p. 887-91.
281. Schmitz, M., et al., *Xenografts of highly resistant leukemia recapitulate the clonal composition of the leukemogenic compartment*. *Blood*, 2011. **118**(7): p. 1854-64.

282. Morisot, S., et al., *High frequencies of leukemia stem cells in poor-outcome childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias*. *Leukemia*, 2010. **24**(11): p. 1859-66.
283. Shultz, L.D., et al., *Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells*. *J Immunol*, 2005. **174**(10): p. 6477-89.
284. Friedline, R.H., et al., *Genetic ablation of lymphocytes and cytokine signaling in nonobese diabetic mice prevents diet-induced obesity and insulin resistance*. *Faseb j*, 2016. **30**(3): p. 1328-38.
285. Behan, J.W., et al., *Activation of adipose tissue macrophages in obese mice does not require lymphocytes*. *Obesity (Silver Spring)*, 2013. **21**(7): p. 1380-8.
286. Anhê, F.F., et al., *A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased Akkermansia spp. population in the gut microbiota of mice*. *Gut*, 2015. **64**(6): p. 872-83.
287. Morel, S., *Protocole de recherche. Relation «cause-effet» de la leucémie lymphoblastique aigüe et de ses traitements dans la genèse des désordres cardiométaboliques dans un modèle murin xénogénique (NOD/SCID/gamma c-)*. 2018.
288. Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley, *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. *J Biol Chem*, 1957. **226**(1): p. 497-509.
289. Caron, A.Z., et al., *The SIRT1 deacetylase protects mice against the symptoms of metabolic syndrome*. *Faseb j*, 2014. **28**(3): p. 1306-16.
290. Arthur, J.C., et al., *Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota*. *Science*, 2012. **338**(6103): p. 120-3.
291. Han, J., et al., *An isotope-labeled chemical derivatization method for the quantitation of short-chain fatty acids in human feces by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Anal Chim Acta*, 2015. **854**: p. 86-94.
292. Fournier, M., et al., *Altered proteome of high-density lipoproteins from paediatric acute lymphoblastic leukemia survivors*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 4268.
293. Caubet Fernandez, M., et al., *A Bayesian multivariate latent t-regression model for assessing the association between corticosteroid and cranial radiation exposures and cardiometabolic complications in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia: a PETALE study*. *BMC Med Res Methodol*, 2019. **19**(1): p. 100.
294. Morel, S., et al., *Intestinal Dysbiosis and Development of Cardiometabolic Disorders in Childhood Cancer Survivors: A Critical Review*. *Antioxid Redox Signal*, 2021. **34**(3): p. 223-251.
295. Bélanger, V., et al., *The Role of Oxidative Stress and Inflammation in Cardiometabolic Health of Children During Cancer Treatment and Potential Impact of Key Nutrients*. *Antioxid Redox Signal*, 2021. **35**(4): p. 293-318.
296. Zhang, H., et al., *Proteus mirabilis inhibits cancer growth and pulmonary metastasis in a mouse breast cancer model*. *PLoS One*, 2017. **12**(12): p. e0188960.
297. Schlachterman, A., et al., *Combined resveratrol, quercetin, and catechin treatment reduces breast tumor growth in a nude mouse model*. *Transl Oncol*, 2008. **1**(1): p. 19-27.
298. Dadachova, E., et al., *Treatment with rhenium-188-perrhenate and iodine-131 of NIS-expressing mammary cancer in a mouse model remarkably inhibited tumor growth*. *Nucl Med Biol*, 2005. **32**(7): p. 695-700.

299. Wang, M., et al., *Humanized mice in studying efficacy and mechanisms of PD-1-targeted cancer immunotherapy*. *Faseb j*, 2018. **32**(3): p. 1537-1549.
300. Nelson, E.R., et al., *27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology*. *Science*, 2013. **342**(6162): p. 1094-8.
301. Alikhani, N., et al., *Mammary tumor growth and pulmonary metastasis are enhanced in a hyperlipidemic mouse model*. *Oncogene*, 2013. **32**(8): p. 961-7.
302. Huang, J., et al., *Tumor-Induced Hyperlipidemia Contributes to Tumor Growth*. *Cell Rep*, 2016. **15**(2): p. 336-48.
303. Duan, W., et al., *Hyperglycemia, a neglected factor during cancer progression*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 461917.
304. Rhee, E.P., et al., *Lipid profiling identifies a triacylglycerol signature of insulin resistance and improves diabetes prediction in humans*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(4): p. 1402-11.
305. Gordon, S.M., et al., *A comparison of the mouse and human lipoproteome: suitability of the mouse model for studies of human lipoproteins*. *J Proteome Res*, 2015. **14**(6): p. 2686-95.
306. Barbosa-Cortés, L., et al., *Adipokines, insulin resistance, and adiposity as a predictors of metabolic syndrome in child survivors of lymphoma and acute lymphoblastic leukemia of a developing country*. *BMC Cancer*, 2017. **17**(1): p. 125.
307. Kartal, İ., et al., *Frequency of obesity and metabolic syndrome in childhood leukemia and lymphoma survivors*. *Diabetol Metab Syndr*, 2022. **14**(1): p. 16.
308. Goldberg, J.F., et al., *Dyslipidemia and Cardiovascular Disease Among Childhood Cancer Survivors: A St. Jude Lifetime Cohort Report*. *J Natl Cancer Inst*, 2023.
309. Surapolchai, P., et al., *Impaired glucose tolerance and insulin resistance in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia: prevalence and risk factors*. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2010. **32**(5): p. 383-9.
310. Long, Y.C. and J.R. Zierath, *AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(7): p. 1776-83.
311. Foretz, M., et al., *[Regulation of energy metabolism by AMPK: a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic and cardiovascular diseases]*. *Med Sci (Paris)*, 2006. **22**(4): p. 381-8.
312. Fang, C., et al., *The AMPK pathway in fatty liver disease*. *Front Physiol*, 2022. **13**: p. 970292.
313. Smith, B.K., et al., *Treatment of nonalcoholic fatty liver disease: role of AMPK*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2016. **311**(4): p. E730-e740.
314. Jensen-Urstad, A.P. and C.F. Semenkovich, *Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: housekeeper or messenger?* *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1821**(5): p. 747-53.
315. Schlaepfer, I.R. and M. Joshi, *CPT1A-mediated Fat Oxidation, Mechanisms, and Therapeutic Potential*. *Endocrinology*, 2020. **161**(2).
316. Houten, S.M. and R.J. Wanders, *A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation*. *J Inher Metab Dis*, 2010. **33**(5): p. 469-77.
317. Kleme, M.L., et al., *CFTR Deletion Confers Mitochondrial Dysfunction and Disrupts Lipid Homeostasis in Intestinal Epithelial Cells*. *Nutrients*, 2018. **10**(7).
318. Xu, Z., et al., *Gut microbiota in patients with obesity and metabolic disorders - a systematic review*. *Genes Nutr*, 2022. **17**(1): p. 2.

319. Stojanov, S., A. Berlec, and B. Štrukelj, *The Influence of Probiotics on the Firmicutes/Bacteroidetes Ratio in the Treatment of Obesity and Inflammatory Bowel disease*. *Microorganisms*, 2020. **8**(11).
320. Singh, V., et al., *Butyrate producers, "The Sentinel of Gut": Their intestinal significance with and beyond butyrate, and prospective use as microbial therapeutics*. *Front Microbiol*, 2022. **13**: p. 1103836.
321. Gibiino, G., et al., *Exploring Bacteroidetes: Metabolic key points and immunological tricks of our gut commensals*. *Dig Liver Dis*, 2018. **50**(7): p. 635-639.
322. Evans, C.C., et al., *Exercise prevents weight gain and alters the gut microbiota in a mouse model of high fat diet-induced obesity*. *PLoS One*, 2014. **9**(3): p. e92193.
323. Liu, J., et al., *Functions of Gut Microbiota Metabolites, Current Status and Future Perspectives*. *Aging Dis*, 2022. **13**(4): p. 1106-1126.
324. Santos-Marcos, J.A., et al., *Sex Differences in the Gut Microbiota as Potential Determinants of Gender Predisposition to Disease*. *Mol Nutr Food Res*, 2019. **63**(7): p. e1800870.
325. Santos-Marcos, J.A., et al., *Interaction between gut microbiota and sex hormones and their relation to sexual dimorphism in metabolic diseases*. *Biol Sex Differ*, 2023. **14**(1): p. 4.
326. d'Afflitto, M., et al., *Association Between Sex Hormone Levels and Gut Microbiota Composition and Diversity-A Systematic Review*. *J Clin Gastroenterol*, 2022. **56**(5): p. 384-392.
327. Valeri, F. and K. Endres, *How biological sex of the host shapes its gut microbiota*. *Front Neuroendocrinol*, 2021. **61**: p. 100912.
328. Mauvais-Jarvis, F., D.J. Clegg, and A.L. Hevener, *The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis*. *Endocr Rev*, 2013. **34**(3): p. 309-38.
329. Brettelle, H., et al., *Sex hormones, intestinal inflammation, and the gut microbiome: Major influencers of the sexual dimorphisms in obesity*. *Front Immunol*, 2022. **13**: p. 971048.

