



**HAL**  
open science

# L'hypoxie contribue à la quiescence et à la chimiorésistance des Cellules Initiatrices des Leucémies Aigües Lymphoblastiques B

Arnaud Villacreces

► **To cite this version:**

Arnaud Villacreces. L'hypoxie contribue à la quiescence et à la chimiorésistance des Cellules Initiatrices des Leucémies Aigües Lymphoblastiques B. Hématologie. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0126 . tel-01044915v1

**HAL Id: tel-01044915**

**<https://theses.hal.science/tel-01044915v1>**

Submitted on 24 Jul 2014 (v1), last revised 7 Mar 2015 (v2)

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE  
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Par **Arnaud VILLACRECES**

**L'hypoxie contribue à la quiescence et à la  
chimiorésistance des Cellules Initiatrices des  
Leucémies Aigües Lymphoblastiques B**

Sous la direction de : Pr. Vincent PRALORAN

Soutenue le jeudi 10 juillet 2014 à 14h00

Membres du jury :

M. MOREAU Jean-François	Professeur des Universités	Bordeaux	Président
Mme. SCHNEIDER Pascale	Professeur des Universités	Rouen	Rapporteur
M. FORMSTECHEP Pierre	Professeur des Universités	Lille	Rapporteur
M. DELLO SBARBA Persio	Professeur des Universités	Firenze (Italie)	Examineur
M. SARRY Jean-Emmanuel	Chargé de recherche INSERM	Toulouse	Examineur



## **L'hypoxie contribue à la quiescence et à la chimiorésistance des Cellules Initiatrices des Leucémies Aigües Lymphoblastiques B**

Notre groupe a montré que l'hypoxie sévère (0.1% O<sub>2</sub>) induit un arrêt du cycle cellulaire en G<sub>0</sub> des cellules humaines CD34<sup>+</sup> et des cellules murines FDCP mix. Peu d'études ont exploré l'existence de Cellules Initiatrices de Leucémie (CIL) dans les LAL et leur rôle dans les rechutes. Notre projet s'est focalisé sur l'effet de l'hypoxie sévère sur la quiescence des CIL dans les LAL, qui pourrait être responsable d'un pourcentage de rechutes. En effet dans la niche hématopoïétique, où sont localisées les Cellules souches hématopoïétiques et probablement les CIL, la concentration d'oxygène avoisinerait 0,1%.

Nous avons utilisé la lignée de LAL NALM6 pour explorer les effets de l'hypoxie sévère sur leur survie, leur cycle cellulaire et leur chimiorésistance. Nos résultats ont mis en évidence qu'une culture à 0.1% O<sub>2</sub> durant 7 jours de la lignée NALM6: - inhibe leur prolifération sans surmortalité, - révèle une population restreinte de CIL quiescentes et chimiorésistantes capables d'induire une leucémie dans des souris. Nous avons recherché les relations entre l'hypoxie sévère et quelques caractéristiques des cellules primaires de patients atteints de LAL : existence et rôle de CIL résistantes à l'hypoxie et aux agents thérapeutiques conventionnels des LAL ; localisation de ces cellules résiduelles dans la moelle osseuse des souris xénotransplantées. Nos résultats suggèrent que certaines rechutes de LAL pourraient être dues à la persistance à long terme de « quiescent/dormant » CIL dans les niches hypoxiques de la moelle osseuse. Ce modèle est intéressant pour explorer les mécanismes *in vitro* et *in vivo* de chimiorésistance dans les LAL et le rôle de l'environnement dans ce phénomène.

**Mots clés :** Hypoxie – Quiescence – Cellules souches Leucémiques - Leucémie Aigüe Lymphoblastique – Chimiorésistance - Rechute

---

## **Hypoxia contributes to quiescence and chemoresistance of Leukemia Initiating Cell in B Acute Lymphoblastic Leukemia**

Our group showed that severe hypoxia (0.1% O<sub>2</sub>) induces G<sub>0</sub> cell-cycle-arrest of human CD34<sup>+</sup> cells and of murine FDCP-mix Cells. Few studies explored the existence of quiescent Leukemia Initiating Cells (LIC) in ALL and their role in primary chemoresistance and relapses. Our project is focused on the effect of very low O<sub>2</sub> concentrations in the maintenance of quiescent LIC in ALL, that could be responsible of a percentage of relapses. Indeed in bone marrow niches, where hematopoietic stem cells and probably LIC are located, the O<sub>2</sub> concentrations are below 0.1%.

In the present study we used the NALM-6 ALL cell line to explore the effects of culture at 0.1% O<sub>2</sub> on their survival, cell cycle and chemoresistance. Our results evidence that a 7 days culture of NALM-6 cells at 0.1% O<sub>2</sub>: - inhibits their proliferation without major cell death; - reveals a restricted LIC population of quiescent and chemoresistant LIC; - maintains quiescent chemoresistant LIC that induce leukemia when injected in immunodeficient mice. We investigated the relationships between severe hypoxia and some characteristics of ALL primary cells obtained from patients: existence and role of quiescent chemoresistant LICs in ALL relapses; location of these residual cells inside the bone marrow of engrafted mice. Our results suggest that some ALL relapses could be due to the long term persistence of "quiescent / dormant" LIC in hypoxic bone marrow niches. This model is of interest for exploring the *in vitro* and *in vivo* (xenograft) mechanisms of chemoresistance in ALL and the role of the bone marrow environment in this phenomenon.

**Keywords :** Hypoxia – Quiescence – Leukemic Stem Cells - Acute Lymphoblastic Leukemia – Chemoresistance - Relapse

---

**Composantes Innées de la Réponse Immunitaire et de la Différenciation**

CNRS UMR 5164 - Université Bordeaux,  
Bat 1B rdc, 146 rue Léo Saignat 33076 BORDEAUX





## Remerciements

Mes premiers remerciements vont, cela va de soi, au Pr Vincent Praloran qui non seulement m'a permis de commencer et de mener à bien cette thèse mais surtout, qui m'a tendu la main lorsque j'étais à la recherche d'un premier CDD (avec un CV qui n'était pas, je me doute, le plus attractif). CDD qui a conduit à une titularisation en tant qu'ingénieur d'étude à l'université... Si on fait les comptes, je vous dois beaucoup...

Je remercie mon actuel directeur d'unité, le Pr Jean-François Moreau, d'avoir accepté spontanément qu'un ingénieur d'étude du laboratoire s'inscrive en Doctorat et d'avoir accepté tout aussi spontanément de présider ce Jury de thèse.

Je remercie les autres membres du Jury d'avoir accepté de juger ce travail :

- Les deux Rapporteurs, Madame le Professeur Pascale Schneider (Rouen) et Monsieur le Professeur Pierre Formstecher (Lille)
- Les deux Examineurs, Monsieur le Docteur Jean-Emmanuel Sarry (Toulouse) et Monsieur le Professeur Persio Dello Sbarba (Firenze)

Je remercie également toutes les personnes qui ont participé à ce travail :

- Frédéric Blanchard ainsi que les techniciens de l'U957 (Nantes) dirigé par le Pr Dominique Heyman, pour m'avoir accueilli dans leur unité durant une semaine et pour avoir réalisé les coupes et marquages histologiques,
- Philippe Brunet de la Grange (EFS Aquitaine Limousin) pour m'avoir aidé à transplanter mes animaux et pour les multiples interactions concernant mon projet de thèse,
- Benoît Rousseau ainsi que les personnels de l'animalerie A2 qui s'occupent admirablement de l'élevage de mes animaux, merci aussi pour vos avis sur des problèmes expérimentaux,
- Vincent Pitard et Santiago Gonzales pour la qualité de service au sein de la plateforme de Cytométrie de l'université,
- Eric Lippert et Melissa Réault du Centre de Ressources Biologiques (CRB – Tumorotheque) du CHU de Bordeaux pour avoir mis à ma disposition des échantillons de cellules de patients,
- Les personnels (Marie et Alex) de la plateforme de Cytométrie de Haut Lévêques (Pessac) qui ont phénotypé mes cellules en sortie d'hypoxie,
- Annie Muniesa, Florence Pradelou, Aurélie Larme et Richard Vinuesa pour toute la partie Logistique-Administrative qui me permettent quotidiennement de travailler dans d'excellentes conditions.
- Mon chef thésard, Yann, qui malheureusement n'a pu me manager qu'une seule petite année mais Ô combien formatrice ...

- Amélie qui a lu, relu et critiqué ce travail (toujours judicieusement bien sûr... même en rentrant d'une réunion professionnelle au pub ou d'un semi-marathon ...).

Je remercie toutes les personnes de l'EFS-AL, du groupe « Cellules Souches », de l'UMR, de l'université de Bordeaux et du monde entier (restons vague pour ne pas risquer d'oublier quelqu'un ...) avec qui j'ai interagit lors de cette thèse.

Plus profond que des mots de remerciement, je dédie ce manuscrit de thèse à ma mère et à mon père qui, d'un certain sens, est le résultat de leur travail.

**Sommaire**

**Abréviations**

**Tables**



Abréviations	1
Table des figures	3
Table des tableaux	9
Introduction	11
1 Les Leucémies Aigües Lymphoblastiques (LAL)	13
1.1 Historique et généralités	13
1.1.1 Historique (Kampen, 2012)(Geary, 2000)	13
1.1.2 Généralités	15
1.2 Traitement des LAL	22
1.2.1 Les schémas thérapeutiques classiques	22
1.2.2 Mode d'action des agents de chimiothérapie.	23
1.2.3 Evolution des résultats thérapeutiques	25
1.2.4 La maladie résiduelle	26
1.3 Les rechutes	27
2 Cellules Souches Leucémiques (CSL) ou Cellules Initiatrices de Leucémies (CIL)...	30
2.1 Généralités	30
2.1.1 Historique	30
2.1.2 Définition d'une cellule souche cancéreuse	33
2.2 Les cellules souches leucémiques (CSL) dans les LAL-B	33
2.2.1 Un phénotype de cellule souche hématopoïétique	33
2.2.2 Un phénotype de progéniteur hématopoïétique	35
2.2.3 La CSL unique et le modèle hiérarchique existent-ils dans les LAL-B ?	37
2.3 CIL, un nom plus approprié	38

## Sommaire

2.4	Conclusion	38
3	Dormance tumorale et dormance cellulaire/quiescence	39
3.1	Dormance de la masse tumorale	39
3.1.1	La dormance angiogénique	39
3.1.2	L'immunosurveillance	40
3.2	La dormance cellulaire ou la quiescence	41
3.2.1	La quiescence des cellules souches	42
3.2.2	Mécanismes de survie des cellules quiescentes	47
4	Rôle de l'environnement et des faibles concentrations d'oxygène dans la quiescence des CSH	49
4.1	Les CSH dans leur environnement normal	49
4.1.1	L'espace médullaire	49
4.1.2	Les CSH dans l'espace médullaire	54
4.2	Inducteurs extrinsèques de la quiescence des CSH	59
4.2.1	Les couples ligands/récepteurs impliqués dans la quiescence	59
4.2.2	Rôle de l'oxygène dans la quiescence	60
5	Quiescence et résistance dans les leucémies aigües	64
5.1	Le modèle des Leucémies Aigües Myéloblastiques (LAM)	64
5.2	Rôle de l'environnement dans la quiescence et la résistance des LAL	66
	Objectifs de travail et approche expérimentale	69
	Résultats	75
6	Cellules NALM6 : L'hypoxie induit quiescence et chimiorésistance <i>in vitro</i> .	77

6.1	Matériel et méthodes	78
6.1.1	Lignée NALM6	78
6.1.2	Protocole de culture primaire (LC1 ; 7 jours)	78
6.1.3	Analyse de la prolifération et de la mortalité cellulaire	78
6.1.4	Analyse du cycle cellulaire en CMF	79
	Analyse de la résistance de la NALM6 aux traitements durant la LC1	80
6.1.5	Etude de la résistance des CIL NALM6 au 5-FU durant la LC1	81
6.2	Résultats	85
6.2.1	La culture de 7 jours en hypoxie induit un ralentissement de la prolifération sans augmentation de la mortalité cellulaire	85
6.2.2	La culture de 7 jours en hypoxie induit la quiescence	87
6.2.3	La culture en hypoxie induit une chimiorésistance	89
6.2.4	La culture en hypoxie induit une résistance au 5-FU des CIL	91
6.3	Synthèse	92
7	Cellules NALM6 : Une partie de la population résiste <i>In vivo</i> à 3 injections de 5-FU	93
7.1	Matériel et méthodes	94
7.1.1	Transplantation de cellules NALM6 à des souris immunodéficientes	94
7.1.2	Sacrifice des animaux et analyse des tissus prélevés	94
7.1.3	Etude en CMF du chimérisme humain NALM6	95
7.1.4	Etude préliminaire en CMF	95
7.1.5	Réalisation des coupes histologiques	96
7.1.6	Colorations et marquages des coupes.	96
7.1.7	Observation des lames	99



## Sommaire

7.2 Etudes préliminaires en CMF : Les cellules NALM6 résiduelles sont non apoptotiques et quiescentes -----	101
7.2.1 Le 5-FU induit chez la NSG une cytopénie médullaire et splénique-----	101
7.2.2 Le 5-FU cible préférentiellement les cellules NALM6 et les induit partiellement en apoptose. -----	101
7.2.3 Les cellules NALM6 quiescentes résistent mieux au traitement par le 5-FU.	103
7.3 Résultats : Etude histologique-----	105
7.3.1 Aspect général d'une coupe de fémur après coloration au Trichrome de Masson -----	105
7.3.2 Détection des cellules humaines par hybridation in situ ALU -----	111
7.3.3 Analyse immunohistochimique par l'anti-Caspase 3 clivée, de l'apoptose des cellules humaines, avant et après traitement au 5-FU-----	115
7.3.4 Analyse immunohistochimique semi-quantitative des cellules humaines résiduelles quiescentes (Ki67 <sup>+</sup> ).-----	119
7.4 Synthèse -----	126
8 Cellules primaires : une partie des cellules leucémiques de patients résiste <i>in vivo</i> à 3 injections de 5-FU -----	129
8.1 Matériel et méthodes -----	130
8.1.1 Echantillons de patients :-----	130
8.1.2 Transplantation et suivi des souris xénotreffées -----	130
8.1.3 Sacrifice des animaux et analyse des tissus-----	132
8.1.4 Identification phénotypique des cellules humaines xénotreffées : -----	132
8.1.5 Analyse en CMF des cellules humaines résiduelles quiescentes (Ki67 <sup>+</sup> ) -----	133
8.2 Résultats -----	134

8.2.1	Etude du chimérisme leucémique après xénogreffe-----	134
8.2.2	Effet du 5-FU sur la persistance des cellules leucémiques xénogreffées-----	140
8.2.3	Etude de la quiescence des cellules leucémiques résiduelles après traitement des animaux au 5-FU-----	145
8.2.4	Résultats des greffes secondaires et tertiaires-----	146
8.3	Synthèse -----	151
8.3.1	Analyse de la greffe de cellules primaires -----	151
8.3.2	Effet du traitement au 5-FU-----	152
	Discussion Conclusion Perspectives -----	153
	Bibliographie -----	163
	Annexe-----	179
9	Annexes : Contribution à la publication du laboratoire-----	181







## Abréviations

5-FU : 5-FluoroUracile	HRE : Hypoxia Response Element
ABCG2 : ATP-Binding Cassette subfamily G member 2	LAL : Leucémie Aigüe Lymphoblastique
Ara-C : Cytarabine	LAM : Leucémie Aigüe Myéloblastique
FAB : French-American-British co-operative group	LBA : Long bone aera
CAR : CXCL12-Abundant Reticular	LC1 ou LC2 : Liquid Culture 1 ou 2
CDK : Cyclin-Dependent Kinase	LSK : Cellule Lin <sup>-</sup> Sca1 <sup>+</sup> cKit <sup>+</sup>
CFU : Colony-Forming Units	MLL : Mix Lineage Leukemia
CIL : Cellule Initiatrice de Leucémie	MPP : MultiPotent Progenitor
CKI : Cyclin-Dependent kinase Inhibitor	MRD : Minimal Residual Desease
CMF : Cytométrie en flux	MSC : Mesenchymal Stem Cell
CRC : Culture Repopulating Cell	mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
CSH : Cellules souches hématopoïétiques	NSG : Souris NOD/SCID Gamma null
CSL : Cellule Souche Leucémique	OPN : Osteopontine
CSPH : Cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques	Phi+1 : Patient N°1, LAL BCR/ABL
DMOG : DiMethylOxaloylGlycine	ROS : Reactive oxygen species
ECM : Extra Cellular Matrix	TA : Température ambiante
EdU : 5-ethynyl-2'-deoxyuridine	TBA : Trabecular bone aera
FACS : Fluorescence-Activated Cell Sorting	TBS : Tris Buffer saline
FISH : Fluorescence In Situ Hybridization	TCA : Cycle de krebs
GMALL : German study group for Adult ALL	Tel1 : Patient N°1, LAL ETV6/RUNX1
HDip1 : Patient N°1, LAL hyperdiploïde	SL-IC : SCID Leukemia-Initiating Cell
HIF : Hypoxia Inducible Factors	SRC : SCID Repopulating Cell



## Table des figures

Introduction.....	11
1 Les Leucémies Aigües Lymphoblastiques (LAL).....	13
Figure 1 : Fréquence en % des anomalies cytogénétiques rencontrées dans les LAL pédiatriques .....	18
Figure 2 : Pathogénèse génétique des LAL-B .....	19
Figure 3 : Courbes de survie de 3 groupes de patients adultes atteints de LAL en fonction de l'âge au diagnostic .....	22
Figure 4 : Cibles des agents chimiothérapeutiques utilisés dans les leucémies aigües.....	24
Figure 5 : Courbes de survie estimées à dix ans (Kaplan-Meier) de 2852 enfants recrutés dans 15 études différentes entre 1962 et 2007 .....	25
Figure 6 : Relations entre les clones détectés au diagnostic et à la rechute, étude réalisée sur un échantillon de 61 patients pédiatriques atteints de LAL.....	28
2 Cellules Souches Leucémiques (CSL) ou Cellules Initiatrices de Leucémies (CIL).....	30
Figure 7 : Modèle stochastique et hiérarchique expliquant l'hétérogénéité tumorale .....	31
Figure 8 : Expression des marqueurs de surface dans la lymphopoïèse B normale.....	33
Figure 9 : A, Analyse du chimérisme médullaire de souris NOD/SCID transplantées avec les cellules de 10 patients pédiatriques.....	35
Figure 10 : Modèle de transformation leucémique proposé par Castor et al.....	36
Figure 11 : Malléabilité et autorenewement des blastes dans les LAL de haut risque ou de risque standard .....	37
3 Dormance tumorale et dormance cellulaire/quiescence .....	39
Figure 12 : Délai de la rechute après traitement .....	39



## *Tables des figures et des tableaux*

Figure 13 : Mécanismes impliqués dans la dormance de la masse tumorale .....	40
Figure 14 : Réversibilité de la phase G0 du cycle cellulaire .....	42
Figure 15 : Régulateurs intrinsèques impliqués dans la sortie de quiescence des CSH murines .....	44
Figure 16 : Rôles de p53 dans la réponse au stress cellulaire (A), dans la quiescence (B) et l'autorenouvellement (C) des CSH.....	45
Figure 17 : Mécanismes de défense des CSH.....	47
4 Rôle de l'environnement et des faibles concentrations d'oxygène dans la quiescence des CSH .....	49
Figure 18 : Structure de la moelle osseuse fémorale .....	50
Figure 19 : Structure vasculaire de la moelle osseuse fémorale.....	51
Figure 20 : Oxygénation de la calvaria murine.....	53
Figure 21 : Distribution des 3 sous-populations de mCSPH dans la métaphyse (A) et dans la diaphyse (B) d'un fémur murin.....	55
Figure 22 : Localisation des CSH dans la moelle osseuse .....	58
Figure 23 : Régulation de la protéine HIF-1 $\alpha$ dans des conditions « normoxiques » et « hypoxiques » et effets envisagés sur la quiescence .....	62
Figure 24 : Représentation schématique de la glycolyse et de l'effet de l'hypoxie sur le métabolisme énergétique.....	63
5 Quiescence et résistance dans les leucémies aigües .....	64
Figure 25 : Mécanismes putatifs d'interaction entre la niche hématopoïétique et les CIL de LAM.....	65
Figure 26 : Modèle de dormance endostéale des LAL induite par l'ostéopontine .....	67
Objectifs de travail et approche expérimentale .....	69

Résultats.....	75
6 Cellules NALM6 : L'hypoxie induit quiescence et chimiorésistance <i>in vitro</i> .....	77
Figure 27 : La LC1 de 7 jours en hypoxie induit un ralentissement majeur de la prolifération de la lignée NALM6 sans augmentation de la mortalité cellulaire .....	84
Figure 28 : Influence de l'O <sub>2</sub> sur le cycle cellulaire de la lignée NALM6 en fonction du temps de LC1.....	86
Figure 29 : L'hypoxie (0,1% d'O <sub>2</sub> ) induit une chimiorésistance de la lignée NALM6 entre J3 et J7 de LC1 .....	88
Figure 30 : L'hypoxie (0,1% d'O <sub>2</sub> ) induit une résistance au 5-FU des CIL de la lignée NALM6 entre J3 et J7 de LC1 .....	90
7 Cellules NALM6 : Une partie de la population résiste <i>In vivo</i> à 3 injections de 5-FU ...	93
Figure 31 : Protocole de transplantation des cellules NALM6 dans la souris NSG .....	94
Figure 32 : 3 injections de 5-FU à des souris NSG xéno greffées NALM6 induisent une cytopénie médullaire et splénique sans diminution majeure du chimérisme médullaire	100
Figure 33 : Les cellules xéno greffées de NALM6 résistantes à 3 injections de 5-FU sont majoritairement quiescentes .....	102
Figure 34 : Coupe sagittale de la TBA distale d'un fémur 21 jours après transplantation de cellules NALM6 (coloration au Trichrome de Masson).....	104
Figure 35 : Coupe sagittale de la métaphyse distale d'un fémur 30 jours après greffe (coloration au Trichrome de Masson).....	106
Figure 36 : Coupe sagittale de la TBA distale d'un fémur 21 jours après transplantation et traitement au 5-FU (coloration au Trichrome de Masson).....	108
Figure 37 : Coupe sagittale de la TBA distale d'un fémur 21 jours après transplantation (marquage ALU) .....	110
Figure 38 : Coupe sagittale de la métaphyse proximale d'un tibia après traitement au 5-FU, 21 jours après transplantation (marquage ALU).....	112

## Tables des figures et des tableaux

Figure 39 : Coupe sagittale de la métaphyse distale d'un fémur, 21 jours après transplantation (marquage Caspase 3 clivée).....	114
Figure 40 : Coupe sagittale de la métaphyse distale d'un fémur 21 jours après transplantation et traitée au 5-FU (marquage Caspase 3 clivée) .....	116
Figure 41 : Coupe sagittale de la TBA distale d'un fémur de NSG, 21 jours post transplantation (marquage Ki67).....	118
Figure 42 : Coupe sagittale de la TBA distale d'un fémur de NSG traitée au 5-FU, 21 jours post transplantation (marquage Ki67) .....	120
Figure 43 : Coupes sériées sagittales de la métaphyse distale d'un fémur de NSG traitée au 5-FU, 21 jours post transplantation (marquage Ki67).....	122
Figure 44 : Coupes sériées sagittales de l'épiphyse distale d'un fémur de NSG traitée au 5-FU, 21 jours post transplantation (marquage Ki67) .....	124
8 Cellules primaires : une partie des cellules leucémiques de patients résiste <i>in vivo</i> à 3 injections de 5-FU.....	129
Figure 45 : Protocole de transplantation et de suivi des cellules leucémiques xénogreffées .....	131
Figure 46 : Evolution du chimérisme des cellules humaines transplantées .....	134
Figure 47 : Cinétique d'envahissement médullaire leucémique par les cellules humaines transplantées .....	135
Figure 48 : Evolution du chimérisme des cellules CD34 <sup>+</sup> dans la population humaine (HLA-DR <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> ) transplantée.....	136
Figure 49 : Comparaison du chimérisme humain dans le fémur injecté, le fémur controlatéral et la rate des souris au sacrifice .....	137
Figure 50 : Envahissement leucémique médullaire et splénique au sacrifice .....	138
Figure 51 : Pourcentage de cellules « primitives » dans la population humaine (HLA-DR <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> ) médullaire et splénique au sacrifice .....	139

Figure 52 : Le 5-FU diminue le nombre de cellules médullaires .....	140
Figure 53 : Taille et chimérisme leucémique des rates de souris xéno greffées au sacrifice .....	141
Figure 54 : Variation de la population leucémique médullaire induite par le 5-FU .....	142
Figure 55 : Pourcentage, par échantillon testé Phi+1 (A), HDip1 (B) et Tel1 (C), de cellules « primitives » (CD34 <sup>+</sup> ) dans la population humaine (HLA-DR <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> ).....	143
Figure 56 : Expression des marqueurs CD19 et CD10 par les cellules CD34 <sup>+</sup> et CD34 <sup>-</sup> médullaires.....	144
Figure 57 : Pourcentage de cellules quiescentes (G0 : Ki67 <sup>-</sup> ) dans la population humaine (HLA-DR <sup>+</sup> ).....	145
Figure 58 : Cinétique de xéno greffe humaine (HLA-DR <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> ) des souris transplantées avec l'échantillon Phi+1 .....	146
Figure 59 : Pourcentage de cellules leucémiques (CD19 <sup>+</sup> CD10 <sup>+</sup> ) et « primitives » (CD34 <sup>+</sup> ) dans la population humaine (HLA-DR <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> ) des fémurs controlatéraux .....	147
Figure 60 : Distribution dans diverses phases du cycle cellulaire de la population humaine (HLA-DR <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> ) des fémurs controlatéraux .....	148
Figure 61 : Distribution dans le cycle cellulaire de la population humaine (HLA-DR <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> ) de 3 receveurs secondaires pré et post injections de 5-FU .....	149
Discussion Conclusion Perspectives .....	153
Bibliographie.....	163



## Table des tableaux

Introduction.....	11
1 Les Leucémies Aigües Lymphoblastiques (LAL).....	13
Tableau 1 : Hémogramme partiel au diagnostic pour un groupe de 41 enfants développant une LAL.....	15
Tableau 2 : Symptômes présents au diagnostic pour un groupe de 41 enfants développant une LAL.....	15
Tableau 3 : Classification OMS des LAL.....	16
Tableau 4: Immunophénotype des différentes classes de LAL-B.....	16
Tableau 5 : Facteurs pronostiques utilisés en clinique adulte et pédiatrique. ....	20
Tableau 6 : Corrélation entre le niveau de la MRD à jour 29 du traitement et l’anomalie cytogénétique au diagnostic de patients pédiatriques.....	27
2 Cellules Souches Leucémiques (CSL) ou Cellules Initiatrices de Leucémies (CIL).....	30
3 Dormance tumorale et dormance cellulaire/quiescence.....	39
Tableau 7 : Liste non exhaustive des régulateurs « intrinsèques » impliqués dans la quiescence des CSH murines.....	46
4 Rôle de l’environnement et des faibles concentrations d’oxygène dans la quiescence des CSH.....	49
Tableau 8 : Liste non exhaustive des couples ligands/recepteurs impliqués dans la quiescence des CSH murines.....	59
5 Quiescence et résistance dans les leucémies aigües.....	64
Objectifs de travail et approche expérimentale.....	69
Résultats.....	75

## Tables des figures et des tableaux

6	Cellules NALM6 : L'hypoxie induit quiescence et chimiorésistance <i>in vitro</i> .....	77
	Tableau 9 : Anticorps utilisés pour caractériser le cycle cellulaire de la NALM6.....	79
	Tableau 10 : Drogues utilisées <i>in vitro</i> durant la LC1.....	80
	Tableau 11 : Anticorps utilisés pour identifier et compter les cellules NALM6 xéno greffées .....	83
7	Cellules NALM6 : Une partie de la population résiste <i>In vivo</i> à 3 injections de 5-FU ...	93
	Tableau 12 : Anticorps utilisés pour caractériser la prolifération et l'apoptose des cellules NALM6 en histologie.....	97
8	Cellules primaires : une partie des cellules leucémiques de patients résiste <i>in vivo</i> à 3 injections de 5-FU.....	129
	Tableau 13 : Caractéristiques des échantillons étudiés.....	130
	Tableau 14 : Anticorps utilisés pour identifier et compter les cellules humaines leucémiques.....	133
	Discussion Conclusion Perspectives .....	153
	Bibliographie.....	163

# Introduction

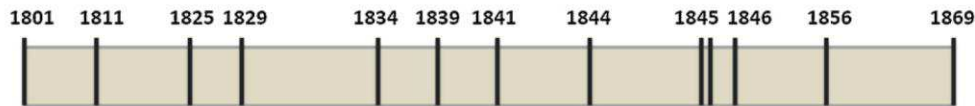




# 1 Les Leucémies Aigües Lymphoblastiques (LAL)

## 1.1 Historique et généralités

### 1.1.1 Historique (Kampen, 2012)(Geary, 2000)



1801	Bichat; defined leucocytosis
1811	Cullen (1 <sup>st</sup> )
1825	Velpeau; accurate description of leukemia with the associated symptoms (2 <sup>nd</sup> )
1829	Collineau (3 <sup>rd</sup> )
1834	Duplay (4 <sup>th</sup> )
1839	Barth (published in 1856) (5 <sup>th</sup> )
1841	Craigie (published in 1845) (6 <sup>th</sup> )
1844	Donné; accurate microscopic examination of the blood from a leukemia patient (histological figures were included in the Atlas published in 1845 7 <sup>th</sup> )
1845	Bennett; termed the disease Leucocythemia (with additional figures of the colorless corpuscles) (8 <sup>th</sup> )
1845	Virchow (termed leukämie in 1847) (9 <sup>th</sup> )
1846	Fuller; patient diagnosed with leukemia during life for the first time (10 <sup>th</sup> )
1856	Virchow; distinction between splenic and lymphatic leukemia
1869	Neumann; physiology of leukemia connected to the bone marrow

14 juin 1810 : L'écossois P. Cullen rapporte pour la première fois que le sérum d'un patient de 35 ans présente une couleur et une consistance laiteuse. Suspectant une absorption importante de graisse, il ne relie pas cette observation avec l'hyperplasie splénique de cet homme. En mars 1825, A. Velpeau décrit de façon précise dans un rapport d'autopsie, les symptômes de la leucémie. Il met en relation un sang rempli de pus et l'hyperplasie de la rate et du foie observé chez un homme de 63 ans. Deux autres cas présentant des symptômes similaires sont décrits par J. Collineau en 1829 et par A. Duplay en 1833.

En 1844, A. Donné, pionnier en microscopie à qui l'on doit la première identification des plaquettes, décrit la cytologie sanguine d'une patiente de 44 ans décédée et présentant une splénomégalie. Il observe que l'aspect laiteux du sang est du à une grande quantité de globules, identiques aux globules normaux. Il est le premier médecin à avoir effectué une description et une illustration de la composition modifiée du sang que l'on observe au microscope chez les patients leucémiques.

## *Introduction – Les leucémies aigües lymphoblastiques*

En Octobre 1845, l'écossais J. Bennett publie un nouveau cas, nomme la maladie « leucocythemia » et propose que l'accumulation de leucocytes de la leucocythemia, est due à une maladie primaire systémique.

Un mois plus tard, à Berlin, R. Virchow publie que l'apparence altérée du sang est due à une dérégulation de la balance entre globules blancs (qui n'ont pas une origine « purulente ») et globules rouges entraînant une suppression de ces derniers. En 1847, il nomme cette maladie « Leukämie ». Il est le premier à distinguer, en 1856, leucémie splénique et leucémie lymphatique. Ses observations ont permis une meilleure compréhension des leucémies.

En 1846, Fuller est le premier à diagnostiquer une leucémie chez un patient encore en vie.

En 1869, E. Newmann observe que la moelle osseuse d'un patient mort de leucémie a une couleur inhabituelle. Il en conclue que la moelle est un site important pour la production des cellules du sang pathologiques et normales. Il suggère l'existence de leucémies « Myélogéniques » a côté des leucémies « lymphatiques » décrites par R. Virchow.

Le développement de méthodes de coloration des cellules du sang par P. Ehrlich permet une avancée dans la classification des leucémies publiée en 1891. Ces travaux permettront de regrouper la leucémie de Virchow et celle de Newmann dans la famille des leucémies « splénomyélogéniques ».

A partir du début du 20<sup>ème</sup> siècle, l'identification de leucémies par des méthodes de coloration de frottis sanguin, est de plus en plus précoce chez des patients présentant peu de symptômes. Le nombre de cas rapportés augmente en parallèle de la capacité des médecins à identifier et classer les leucémies dans diverses catégories.

En 1976, une équipe d'hématologistes français, américains et britanniques propose un nouveau système international de classification des leucémies (Bennett et al., 1976) basé essentiellement sur une approche morphologique de frottis de moelle.

En 1995, grâce au développement des anticorps monoclonaux, l'EGIL (European Group for the immunological classification of leukémias) propose un classement des leucémies aigües basé uniquement sur des critères immunophénotypiques (Bene et al., 1995).

Actuellement, ces classements sont complétés voire remplacés par la classification plus exhaustive de l'organisation mondiale de la santé (OMS). Elle se base sur un ensemble de critères dont des critères génétiques qui prennent une importance croissante (Swerdlow et al., 2008; Vardiman et al., 2009).

## 1.1.2 Généralités

### 1.1.2.1 Définition

Les Leucémies Aigües Lymphoblastiques (LAL) sont des hémopathies malignes caractérisées par l'expansion clonale de cellules lymphoïdes immatures ayant perdu leur capacité de maturation terminale, les blastes. Les blastes s'accumulent au sein de la moelle osseuse, entraînent une répression de l'hématopoïèse normale et donc une pancytopenie sanguine et colonisent le sang très souvent et parfois d'autres tissus. Le tableau 1 montre des données d'hémogramme établies à partir de 41 patients leucémiques pédiatriques (médiane d'âge de 13 mois) (Ibagy et al., 2013). On constate chez au moins 75% de ces patients une hyperleucocytose, une anémie et une thrombopénie.

Issu de la même étude, le tableau 2 énumère les signes cliniques observés au diagnostic. Les signes les plus récurrents (présents au moins chez la moitié des malades) sont la fièvre, les ecchymoses/pétéchies et l'hépatomégalie.

Hematological alterations	n	%
Leukocytes < 10,000	10	24.39
10,000 < leukocytes < 50,000	12	29.27
50,000 < leukocytes < 100,000	5	12.19
Leukocytes >100,000	14	34.14
Hemoglobin < 7	14	34.14
7 < hemoglobin < 11	25	60.97
Hemoglobin > 11	2	4.87
Platelets < 20,000	2	4.87
20,000 < platelets < 100,000	29	70.73
Platelets >100,000	10	24.39

**Tableau 1 : Hémogramme partiel au diagnostic pour un groupe de 41 enfants développant une LAL. n= nombre d'enfants (Ibagy et al., 2013)**

Signs and symptoms	n	%
Fever	25	60.97
Bone pain	2	4.88
Lymphadenomegaly	12	29.26
Ecchymosis/petechiae	22	53.66
Mucosal bleeding	4	9.76
Hepatomegaly	24	58.53
Splenomegaly	16	39.02

**Tableau 2 : Symptômes présents au diagnostic pour un groupe de 41 enfants développant une LAL. n= nombre d'enfants (Ibagy et al., 2013)**

### 1.1.2.2 Classification des LAL

Selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), révisée en 2008 (Swerdlow et al., 2008), les LAL sont divisées en LAL-T et LAL-B, en fonction de la lignée lymphoïde affectée. Les LAL-B sont subdivisées en fonction de l'anomalie cytogénétique rencontrée (Tableau 1). Dans les LAL-T, malgré la diversité des anomalies cytogénétiques, l'absence de différences clinico-biologiques a amené l'OMS à ne pas les subdiviser (Vardiman et al., 2009).

<b>B lymphoblastic leukemia/lymphoma</b>
B lymphoblastic leukemia/lymphoma, <i>No otherwise specified</i>
B lymphoblastic leukemia/lymphoma with recurrent genetic abnormalities
B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL 1</i>
B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(v;11q23); <i>MLL</i> rearranged
B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(12;21)(p13;q22) <i>TEL-AML1</i> ( <i>ETV6-RUNX1</i> )
B lymphoblastic leukemia/lymphoma with hyperdiploidy
B lymphoblastic leukemia/lymphoma with hypodiploidy
B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(5;14)(q31;q32) <i>IL3-IGH</i>
B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(1;19)(q23;p13.3); <i>TCF3-PBX1</i>
<b>T lymphoblastic leukemia/lymphoma</b>

**Tableau 3 : Classification OMS des LAL** (Vardiman et al., 2009)

Une seconde approche de classification des LAL est fondée sur leurs caractéristiques phénotypiques. Le tableau 4 reprend les « Clusters » de Différenciation (CD) retrouvés à la surface des cellules de LAL-B (Thomas, 2005).

B-cell lineage	DR	CD19	CD24	CD10	CD20	CD21	CD22	CD23	clg	slg
Early pre-B	+	+	+	+	±	-	cyt	-	-	-
Pre-B	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Transitional B	+	+	+	±	+	+	+	-	+	+μ
Mature B	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+

**Tableau 4: Immunophénotype des différentes classes de LAL-B** (Thomas, 2005).

### **1.1.2.3 Epidémiologie**

En 2013, aux Etats-Unis, 6000 nouveaux cas ont été diagnostiqués avec une prédominance chez les hommes (ratio homme/femme autour de 1,3) (Siegel et al., 2013). L'incidence estimée dans les pays de l'Europe et de l'Amérique du nord, est de 1,25 nouveaux cas par an pour 100 000 habitants (Yeoh et al., 2013).

Les leucémies aigües lymphoblastiques sont distribuées de façon bimodale dans la population, avec un pic chez les enfants de 2 à 5 ans (80% des leucémies aigües) et un second chez les adultes autour de 50 ans (20% des Leucémies aigües) (Cornell and Palmer, 2012).

Les LAL représentent 25% des cancers pédiatriques (pathologie tumorale pédiatrique la plus fréquente ; à 80% de type-B) (Sinnott et al., 2007) mais sont bien plus rares chez les adultes (< 1% des cas de cancers adultes) (Kim et al., 2006). La proportion des LAL-T est deux fois moins importante chez les enfants (12%) que chez les adultes (24%) (Pui et al., 2004).

Comme pour tous les cancers, l'apparition d'une leucémie aigue lymphoblastique n'est pas due à une cause unique mais à une série d'altérations successives combinatoires (Greaves, 2006). Durant les dernières décennies, de très nombreux agents favorisant l'apparition d'une LAL ont été évoqués/identifiés (Kim et al., 2006) mais sont régulièrement contestés. Seules les études épidémiologiques impliquant les rayonnements ionisants comme cause de LAL chez les survivants des bombes atomiques de 1945 semblent incontestables (Preston et al., 1994).

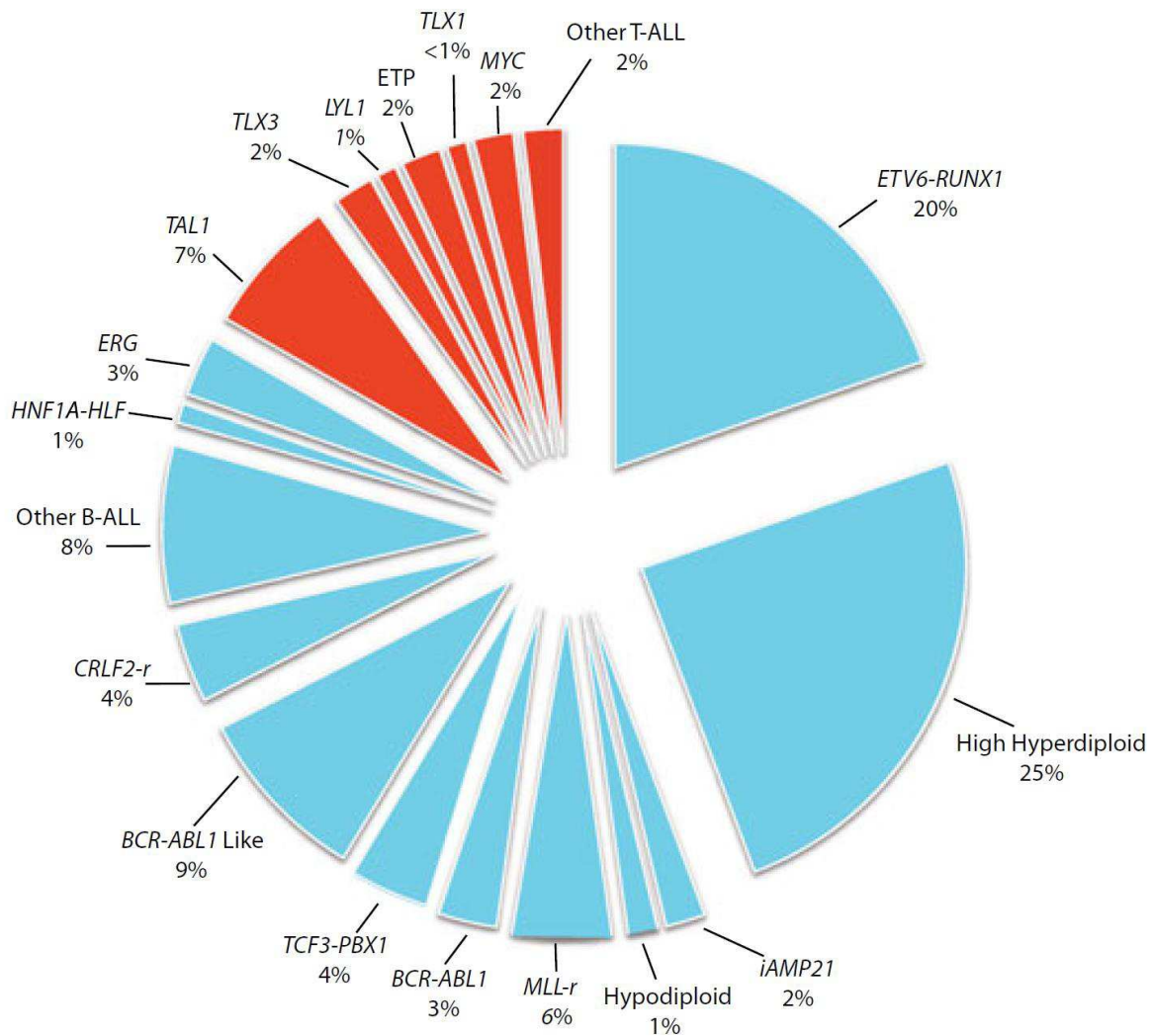
Les réponses immunitaires anormales aux infections bactériennes ou virales sont, à ce jour, les éléments déclencheurs les plus probables des LAL chez des sujets prédisposés (Inaba et al., 2013). Pour Greaves, les infections virales précoces (pré ou post natales) stimuleraient le système immunitaire et diminueraient ainsi le risque de LAL (Greaves and Buffler, 2009). Inversement, les infections tardives entraîneraient des altérations géniques supplémentaires et favoriseraient ainsi l'apparition des LAL.

### **1.1.2.4 Les anomalies cytogénétiques des LAL**

Les LAL sont regroupées en sous-types en fonction des anomalies cytogénétiques primaires identifiées (figure 1) (Pui et al., 2012; Teachey and Hunger, 2013).

## Introduction – Les leucémies aigües lymphoblastiques

Dans les modèles expérimentaux, les réarrangements chromosomiques (figure 1) peuvent amener des activations oncogéniques (MYC), des activations constitutives de tyrosines kinases (ABL1) ou des perturbations de gènes impliqués dans la lymphopoïèse (ex : ETV6-RUNX1). Mais ces perturbations géniques n'entraînent pas à elles seules la transformation leucémique.



**Figure 1 : Fréquence en % des anomalies cytogénétiques rencontrées dans les LAL pédiatriques ; en bleu les LAL-B (83%), en rouge les LAL-T (17%) (Teachey and Hunger, 2013)**

### 1.1.2.5 Les altérations additionnelles

Dans la majorité des cas, la leucémogénèse est induite par l'association, aux mutations génétiques primaires, d'altérations additionnelles de nature et fréquence très diverses



(figure 2) (Inaba et al., 2013). Par exemple, les LAL à réarrangements MLL ne portent, en moyenne et par cas, qu'une seule mutation additionnelle alors que les LAL à translocation ETV6-RUNX1, présentent 6 à 8 altérations additionnelles (Inaba et al., 2013). Dans deux tiers des LAL-B, les altérations génétiques secondaires touchent des régulateurs transcriptionnels de la différenciation lymphoïde tel que PAX5, IKZF1, EBF1.

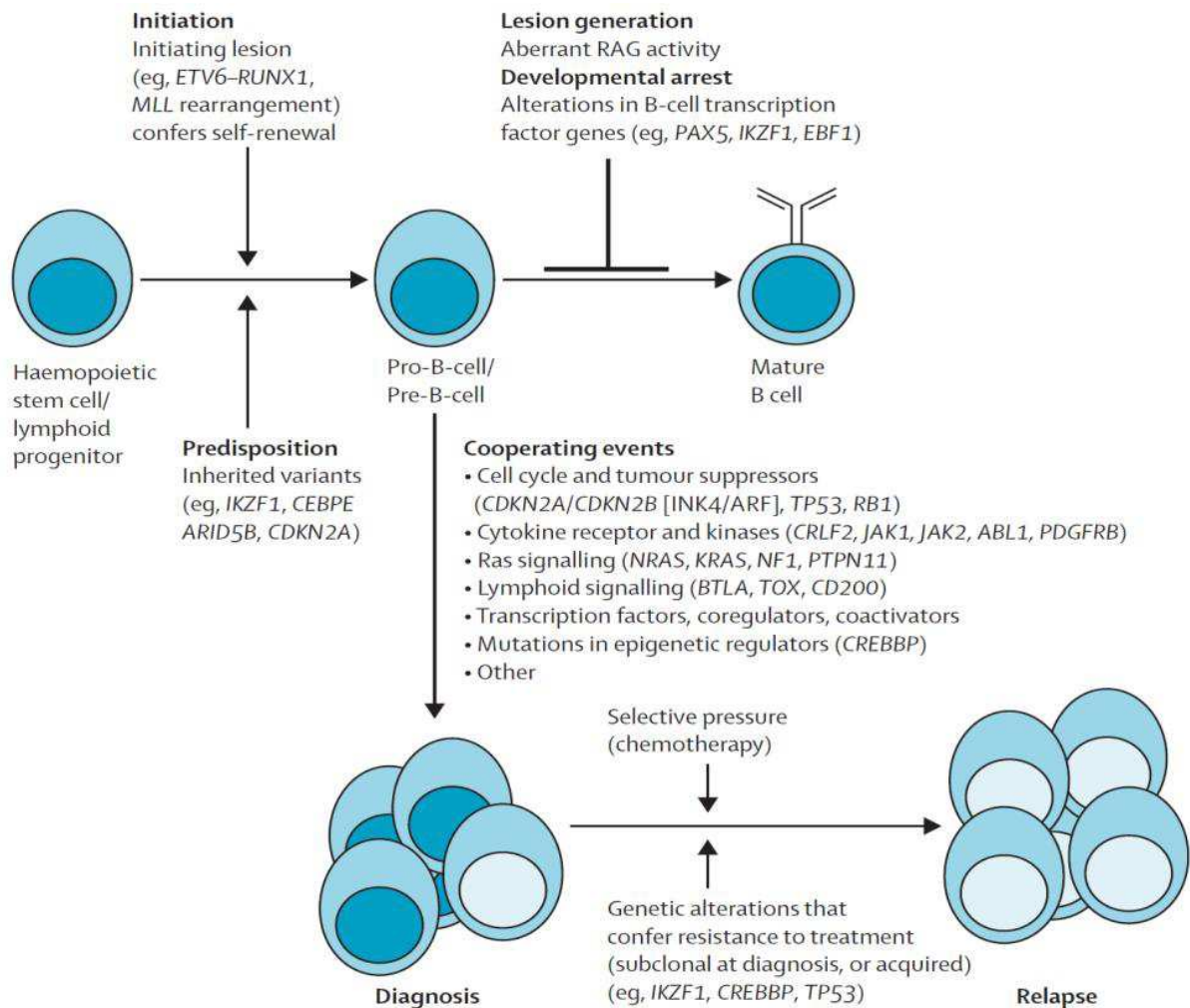


Figure 2 : Pathogénèse génétique des LAL-B (Inaba et al., 2013)

### 1.1.2.6 Pronostic

Depuis plus d'une dizaine d'année, les anomalies cytogénétiques primaires des LAL sont systématiquement recherchées car elles permettent d'établir un pronostic individuel pour chaque patient (Pui et al., 2011).



## Introduction – Les leucémies aigües lymphoblastiques

Dans les LAL-B, les hyperdiploïdies (plus de 50 chromosomes par cellule) et les translocations ETV6-RUNX1 (t(12 ;21), appelée aussi TEL/AML1) sont associées à des pronostics très favorables (Armstrong and Look, 2005). Inversement, les hypodiploïdies (moins de 45 chromosomes par cellule), les translocations BCR-ABL (t(9 ; 22)) et les réarrangements MLL sont associés à des pronostics défavorables (Gleißner et al., 2002; Mancini et al., 2005; Pui et al., 2004).

Ces anomalies cytogénétiques primaires ne pouvant à elle seules prédire précisément un risque de rechute, les études s'orientent de plus en plus vers la recherche d'un rôle des altérations génétiques additionnelles dans le risque de rechute (Ibagy et al., 2013).

De nombreux facteurs de mauvais pronostic ont à ce jour été identifiés tel que l'énumération des leucocytes sanguin, l'envahissement blastique du système nerveux central ... (Narayanan and Shami, 2012). Le tableau 5 énumère quelques données prises en compte chez les adultes et les enfants (Stock, 2010).

PROGNOSTIC FACTORS	STANDARD	ADVERSE
<b>ADULT</b>		
Age (years)	<35	>60
Leukocyte count (x10 <sup>9</sup> /L)	<30	>100
Immunophenotype	Mid T-cell (cortical)	Early T-cell, Mature T-cell
Genotype	-----	<i>BCR-ABL1</i>
		<i>MLL-AF4/ other MLL</i>
		Hypodiploidy < 44
		Complex ( ≥ 5 abnormalities)
Minimal residual disease after induction	<0.01%	>0.01%
	FAVORABLE	ADVERSE
<b>PEDIATRICS</b>		
Age (years)	1 to 9	<1 or ≥10
Leukocyte count (x10 <sup>9</sup> /L)	<50	>50
Immunophenotype	Precursor B-cell	Early thymic precursor
Genotype	Hyperdiploidy >50 <i>ETV6-RUNX1</i>	Hypodiploidy <44 <i>BCR-ABL1</i>
		<i>MLL-AF4/ other MLL</i>
Minimal residual disease after induction	<0.01%	≥1%

Tableau 5 : Facteurs pronostiques utilisés en clinique adulte et pédiatrique. Adapté de Stock, 2010

- **Les différences de pronostic selon l'âge**

Malgré des mécanismes d'induction similaires, les anomalies cytogénétiques rencontrées dans les LAL de l'adulte et de l'enfant diffèrent par leur fréquence (Faderl et al., 2010; Mrózek et al., 2009; Pui et al., 2004) et jouent un grand rôle dans les différences de pronostic.

Chez l'enfant, les anomalies ETV6-RUNX1 et les Hyperdiploïdies associées à un pronostic favorable, sont largement dominantes et représentent à elles seules approximativement 50% des LAL. La fréquence des anomalies associées à un mauvais pronostic est de moins de 10%.

Inversement, les LAL de mauvais pronostic sont chez l'adulte les plus fréquentes (approximativement 40% des cas). La translocation BCR-ABL (chromosome Philadelphie) représente dans certaines études jusqu'à 30% des cas.

- **Le pronostic des LAL de l'adulte s'aggrave avec l'âge.**

L'âge croissant est à lui seul un facteur pronostique essentiel chez l'adulte (Gökbuget, 2013) et à un moindre degré chez l'enfant. Chez l'enfant, la survenue d'une LAL dès la première année est également un élément très péjoratif. La faible tolérance aux chimiothérapies des patients âgés contraint à utiliser des traitements moins agressifs que chez l'enfant, ce qui conduit à des taux de rechute plus importants (Narayanan and Shami, 2012).

La figure 3 montre clairement l'incidence de l'âge sur la survie. D'autres paramètres expliquent aussi le pronostic plus défavorable chez les personnes âgées (comorbidité due le plus fréquemment à des problèmes cardiovasculaires, pulmonaires, de diabète ; 84% des patients âgés de plus de 55 ans dans une étude du GMALL), l'augmentation du risque d'infection, le statut psychologique ou la situation sociale (Gökbuget, 2013).

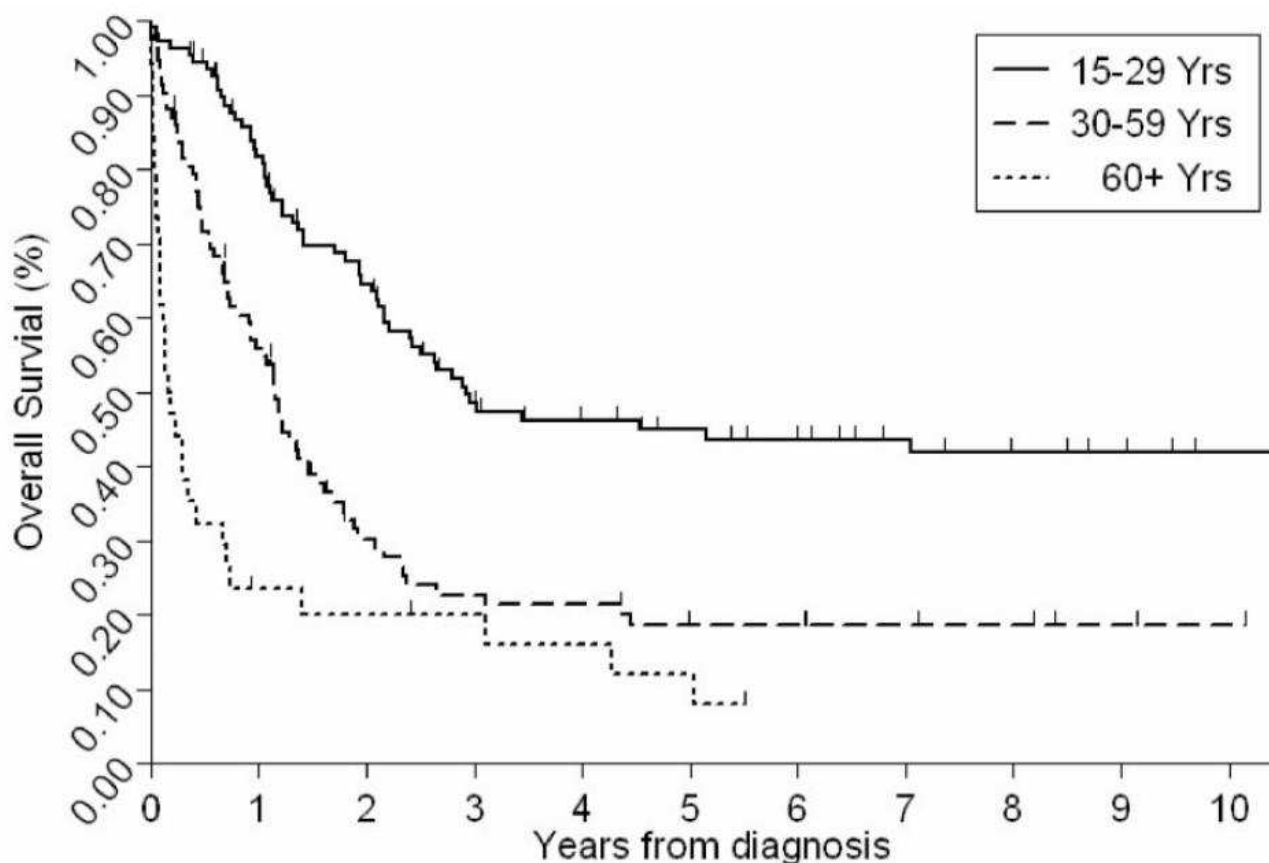


Figure 3 : Courbes de survie de 3 groupes de patients adultes atteints de LAL en fonction de l'âge au diagnostic (Moorman et al., 2010). Groupes : - 60+ ans, n=34 ; - 30-59, n=92 ; - 15-29, n=108

L'association de tous ces facteurs est utilisée en clinique pour établir différents schémas de stratification du risque de rechute allant de 2 à 4 catégories (risques faible, standard, haut et très haut) utilisés pour optimiser l'efficacité des traitements tout en évitant des toxicités excessives.

## 1.2 Traitement des LAL

### 1.2.1 Les schémas thérapeutiques classiques

Les protocoles de traitement multidrogués (plus ou moins agressifs) prennent en compte les scores obtenus dans les tableaux de stratification du risque de rechute. Ils durent typiquement entre 2 et 2,5 ans et comprennent trois phases successives : - une phase d'induction de la rémission (4 à 6 semaines), - une phase de consolidation (20 à 30

semaines ; elle cible les cellules leucémiques résiduelles), - une phase de maintenance de longue durée (2 ans) (Inaba et al., 2013; Pui and Evans, 2006).

Les drogues les plus utilisées sont les glucocorticoïdes (dexaméthasone ou prednisolone), la vincristine, l'asparaginase, les anthracyclines (daunorubicin ou doxorubicin), le méthotrexate et la mercaptopurine. Pour les risques plus élevés, d'autres drogues peuvent être administrées conjointement comme par exemple chez les patients BCR-ABL positifs, des inhibiteurs de tyrosine kinase (Imatinib).

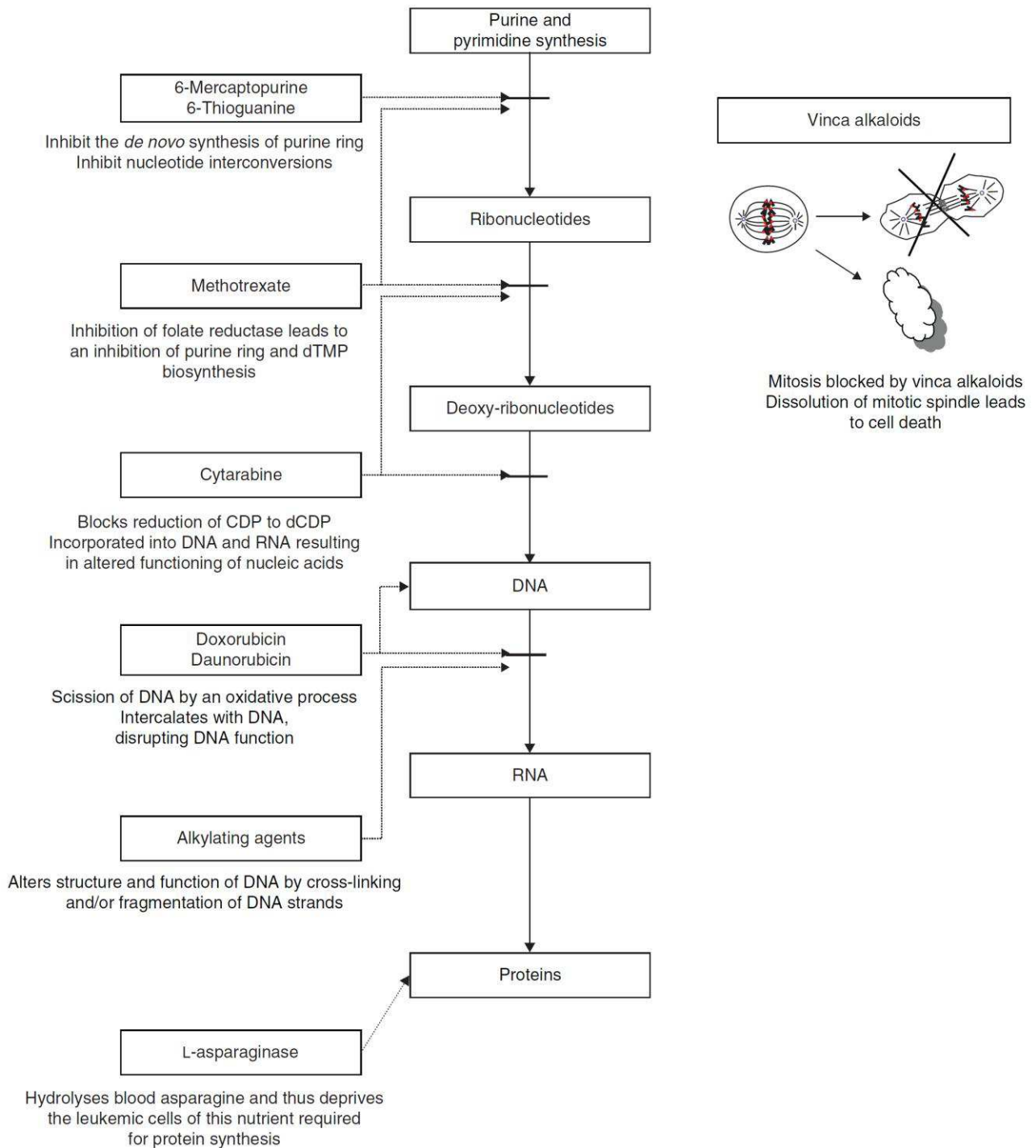
Chez les patients à haut risque qui rechutent, une transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques sera réalisée lorsque les conditions de compatibilité avec le donneur et d'âge du patient sont remplis (Balduzzi et al., 2014).

### **1.2.2 Mode d'action des agents de chimiothérapie.**

La figure 4 décrit succinctement le mode d'action des différentes drogues utilisées pour traiter les LAL (Thomas, 2009).

Les glucocorticoïdes (non mentionnés dans la figure 4), première classe de molécule utilisée pour traiter les LAL, restent un élément majeur du traitement. Après leur internalisation dans la cellule (transport passif), ils se complexent à leurs récepteurs cytoplasmiques. Ces hétérocomplexes sont transloqués dans le noyau soit sous forme monomérique, soit sous forme dimérique. Les homodimères en se fixant sur les séquences GRE (Glucocorticoïd-Response Element) ont un rôle de transactivateur de gènes ; les monomères, de répresseur génique (notamment de la signalisation NFκB). Ensemble, ces voies vont modifier l'expression d'oncogènes, inhiber la production de cytokines, induire l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Inaba and Pui, 2010).

## Introduction – Les leucémies aigües lymphoblastiques



**Figure 4 : Cibles des agents chimiothérapeutiques utilisés dans les leucémies aigües** (Thomas, 2009).

Le 5-FluoroUracile (5-FU) (utilisé dans ces travaux de thèse) est un équivalent de la cytarabine (qui ne cible pas le même nucléotide). Analogue de l'Uracile, le 5-FU est converti dans la cellule en : - FdUMP qui inhibe la biosynthèse de la thymidine triphosphate ; - FdUTP qui crée des dommages à l'ADN durant la phase de réplication du

cycle cellulaire (phase S) ; - FUTP qui crée des dommages à l'ARN durant la transcription (Longley et al., 2003). Non utilisé en hématologie clinique, il est surtout prescrit dans les cancers du sein ou colorectaux. Le 5-FU est très utilisé en biologie dans l'étude du cycle cellulaire, dans les études d'hématologie expérimentale sur la quiescence des CSH.

### 1.2.3 Evolution des résultats thérapeutiques

#### 1.2.3.1 Des résultats qui s'améliorent d'année en année

Depuis plus de 50 ans, le grand nombre d'études protocolaires successives sur des cohortes de patients, la prise en compte des résultats antérieurs pour la conception de nouveaux schémas thérapeutiques, la découverte de nouvelles molécules et l'optimisation de l'utilisation des drogues en fonction du pronostic initial ont bouleversé les taux de guérison des enfants atteints de LAL. En 50 ans, les chances de survie d'un patient pédiatrique sont passées de 10 à 90% environ (figure 5) (Pui and Evans, 2013).

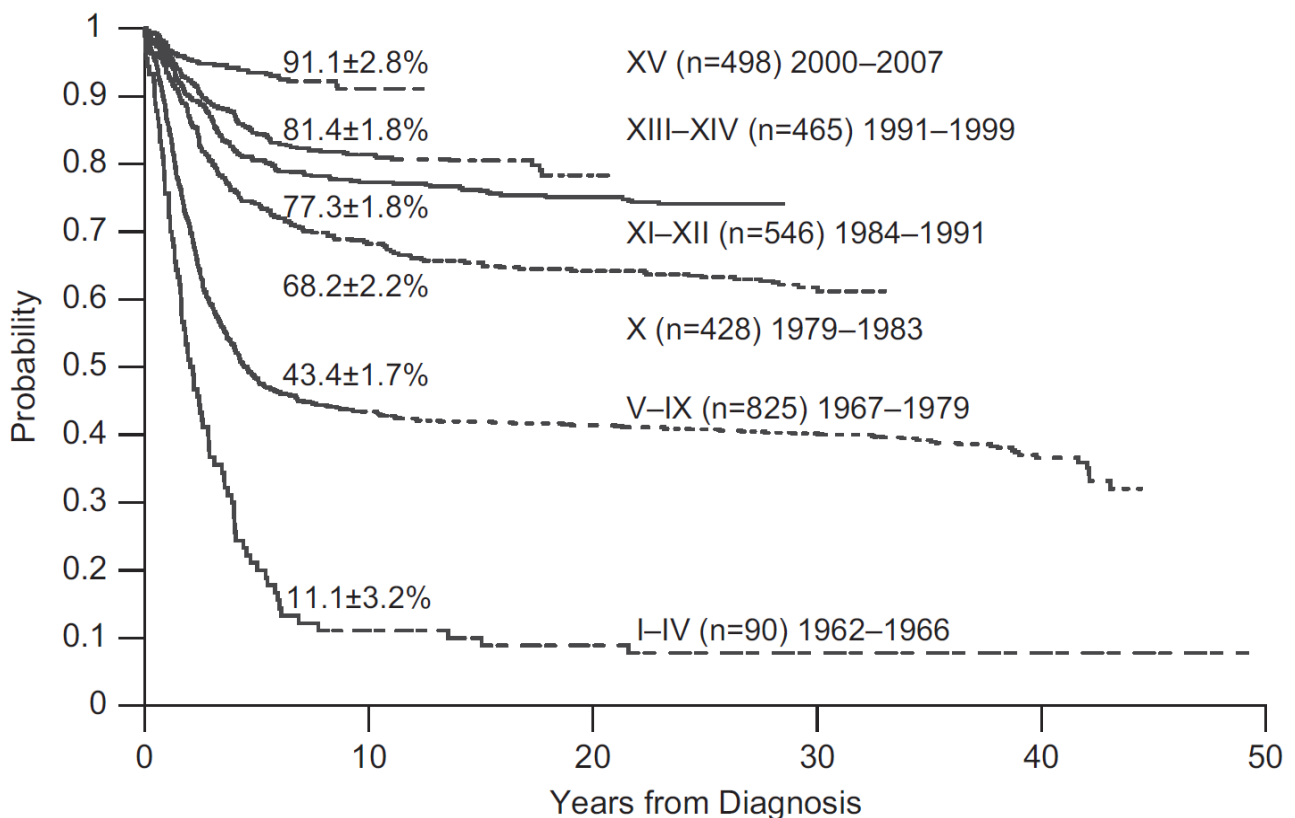


Figure 5 : Courbes de survie estimées à dix ans (Kaplan-Meier) de 2852 enfants recrutés dans 15 études différentes entre 1962 et 2007 (Pui and Evans, 2013).

### **1.2.3.2 Des résultats toujours insuffisants chez les adultes**

Les très bons résultats obtenus chez les patients pédiatriques sont obscurcis par ceux obtenus chez les adultes (figure 3). Seuls 40% des moins de 60 ans survivent à long-terme, 15% des patients entre 60 et 70 ans et moins de 5% des patients de plus de 70 ans. Ces mauvais résultats incombent en partie à la fréquence importante (>40%) des LAL de mauvais pronostic (Cornell and Palmer, 2012), mais aussi, en particulier chez les sujets âgés, à la moindre tolérance aux chimiothérapies lourdes.

Toutefois, l'amélioration des protocoles de transplantations allogéniques de cellules souches hématopoïétiques, a élevé à plus de 50% les chances de survie chez les adultes de moins de 60 ans susceptibles d'être greffé (Pui and Evans, 2006; Thomas et al., 2004).

### **1.2.4 La maladie résiduelle**

La rémission complète hématologique était classiquement définie par la reprise d'une hématopoïèse normale avec une infiltration blastique médullaire inférieure à 1% à l'examen cytologique. Les progrès techniques permettent maintenant de mesurer des niveaux beaucoup plus bas de maladie résiduelle minimale (MRD). Elle est définie comme étant le pourcentage de cellules leucémiques détectées dans la population de cellules médullaires après obtention de la rémission complète hématologique. La MRD représente un paramètre essentiel pour le choix de la meilleure stratégie thérapeutique (Campana and Leung, 2013). Sa définition a évolué avec l'amélioration des capacités techniques de détection des blastes leucémiques (cytologie, immunophénotype, quantification moléculaire). Elle est par exemple considérée comme positive lorsque les blastes de LAL dépassent 0,01% des cellules mononuclées de la moelle osseuse en CytoMétrie en Flux (CMF) et 0,001% par PCR quantitative. C'est le seuil de 0,01% qui est considéré comme utile en pratique clinique (Campana, 2009).

Les travaux réalisés depuis des années ont montré qu'il existe une relation entre le taux de cellules résiduelles après le traitement d'induction et les anomalies cytogénétiques présentes au diagnostic (tableau 6) (Borowitz et al., 2003; Pui et al., 2001). Les LAL à anomalies génétiques de mauvais pronostic présentent des pourcentages de MRD élevés après traitement.

<i>Abnormality</i>	<i>MRD &gt;0.1%</i>	<i>MRD &gt;0.01%</i>
BCR-ABL	16/18 (89%)	16/18 (89%)
E2A-PBX1	4/38 (10.5%)	5/38 (13.2%)
TEL-AML1 <sup>a</sup>	5/208 (2.4%)	17/208 (8.2%)
Trisomies 4 and 10 <sup>a</sup>	20/207 (9.7%)	42/207 (20.3%)

<sup>a</sup>MRD frequencies are significantly different between TEL-AML1 patients and favorable trisomy patients ( $P=0.001$ , Kruskal-Wallis test).

**Tableau 6 : Corrélation entre le niveau de la MRD à jour 29 du traitement et l'anomalie cytogénétique au diagnostic de patients pédiatriques** (Borowitz et al., 2003).

La MRD peut être à l'origine de rechutes. Le risque de rechute chez un patient sera considéré comme très élevé si la MRD dépasse 0,1% après le traitement d'induction, (Campana, 2009).

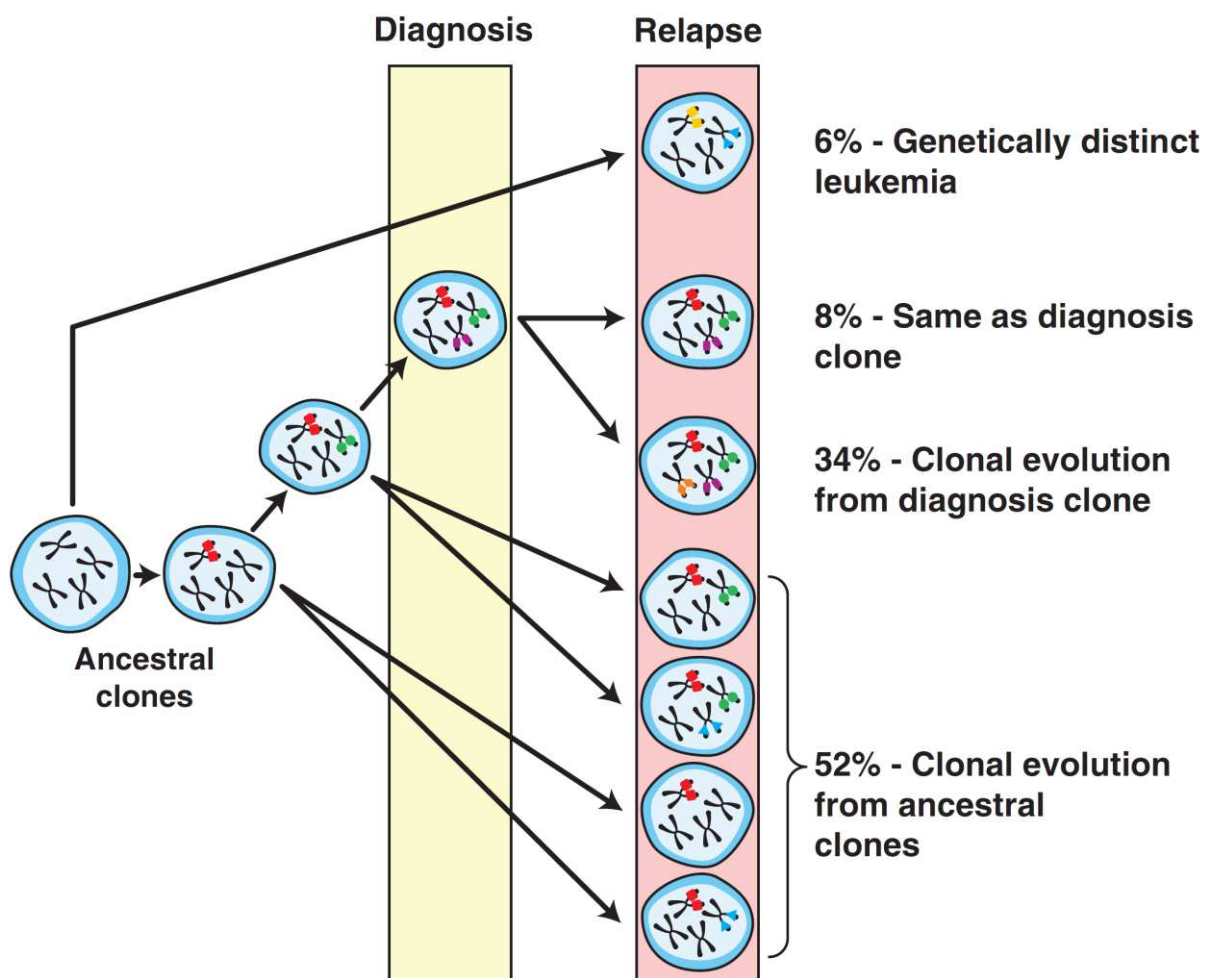
### **1.3 Les rechutes**

Malgré les améliorations du traitement des LAL, les taux de rechute restent élevés avec des chances de survie faible, inférieures à 30% (Kuiper et al., 2010; Rivera et al., 2005). Lors des rechutes, les blastes leucémiques sont généralement plus résistants aux traitements que les blastes présents au diagnostic. L'émergence d'un sous-clone leucémique résistant, présent au diagnostic et sélectionné par le traitement, ou apparu durant le traitement par acquisitions d'anomalies additionnelles est probablement responsable de la résistance et de la rechute dans la majorité des cas. Les mécanismes exacts de résistance restent à ce jour peu connus (Bhojwani and Pui, 2013).

Des études comparatives du transcriptome des blastes au diagnostic et à la rechute précoce ont montré, dans les clones résistants, une surexpression de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire, dans la réparation de l'ADN et la survie cellulaire (Bhojwani et al., 2006).



La figure 6 est issue d'une étude comparative des anomalies génétiques au diagnostic et lors de la rechute de LAL (Mullighan et al., 2008). Dans cette étude, seulement 8% des enfants présentent des clones identiques à ceux du diagnostic. Pour 34% d'entre eux, le clone responsable de la rechute est une évolution du clone au diagnostic. Pour plus de la moitié des patients, le clone émergeant et résistant dérive d'un ancêtre commun. Il est à noter que dans 6% des cas, aucune altération présente à la rechute ne l'est au diagnostic, suggérant que la rechute est en réalité une deuxième leucémie, dérivée d'un clone ancestral porteur de mutation(s) préleucémique(s). Ces résultats sur l'évolution clonale ont récemment été corroborés par deux études sur des LAL ETV6-RUNX1 et BCR-ABL positives (Anderson et al., 2011; Notta et al., 2011).



**Figure 6 : Relations entre les clones détectés au diagnostic et à la rechute, étude réalisée sur un échantillon de 61 patients pédiatriques atteints de LAL (Mullighan et al., 2008).**

Pour certains types de LAL et notamment dans 20% des cas pour les ETV6-RUNX1 (bon pronostic), la rechute est beaucoup plus tardive, quelques années voire occasionnellement 10 à 20 ans après le traitement (Delft et al., 2011; Gandemer et al., 2012). Des résultats similaires de rechute tardive (à 5 ans) ont été publiés chez des patients atteints de LAL hyperdiploïdes (Davidsson et al., 2010). Une des hypothèses est que cette nouvelle LAL soit due à des cellules souches préleucémiques présentant la même anomalie primaire et ayant subi des altérations additionnelles différentes.

En 2008, Mullighan publie que ces rechutes ne peuvent pas être liées à une lésion génétique unique ou à l'altération d'une seule voie de signalisation. C'est la diversité des mutations qui contribue à la rechute, notamment celles impliquant des régulateurs clefs tels que les suppresseurs de tumeur, les protéines du cycle cellulaire et de la différenciation lymphoïde.

Chez certains patients, la rechute (précoce ou tardive) peut être extra médullaire, dans des sites dits « sanctuaires » (testicules, ovaires et système nerveux central) dans lesquels la diffusion et donc la concentration des drogues reste plus basse. Avec l'amélioration des protocoles de traitement (en particulier les chimiothérapies intrathécales) ces rechutes sont devenues moins fréquentes.

Le peu de lésions de gènes impliqués dans l'importation ou l'exportation des drogues, les voies métaboliques ciblées et la réponse aux drogues, suggère que le mécanisme de rechute est plus complexe que la simple «résistance aux médicaments » (Mullighan et al., 2008). Certaines rechutes pourraient s'expliquer par le maintien en quiescence ou dormance de cellules leucémiques qui échapperaient ainsi aux drogues cytotoxiques dont la majorité agit sur les cellules métaboliquement actives et proliférantes (Delft et al., 2011; Kuster et al., 2011).

## **2 Cellules Souches Leucémiques (CSL) ou Cellules Initiatrices de Leucémies (CIL)...**

Obtenir la guérison de la LAL chez tous les malades dès le traitement initial reste un objectif à atteindre. Y parvenir impliquera l'éradication ou la mise en dormance définitive du/des clones responsables du développement et de la rechute leucémique. Le décryptage des mécanismes moléculaires et cellulaires, responsables de la survie et de la résistance des cellules initiatrices de LAL dans leur environnement tumoral médullaire ou extramédullaire, est indispensable pour parvenir à l'objectif de guérison sans rechute.

### **2.1 Généralités**

#### **2.1.1 Historique**

L'hétérogénéité tumorale n'est pas un concept récent. Depuis un siècle, de nombreuses publications en font état dans les leucémies, principalement sur des critères morphologiques, avec des tumeurs composées de cellules plus ou moins différenciées aux potentiels prolifératifs variables (Dick, 2008). Dans les LAM, Buick et McCulloch ont montré l'hétérogénéité de la capacité d'auto-renouvellement au sein de la population tumorale par des tests de clonogénicité en série dans des milieux semi-solides (Buick et al., 1979; McCulloch and Till, 1981). Deux modèles peuvent expliquer l'hétérogénéité tumorale (figure 7) (Dick, 2008) :

- le modèle stochastique prédit que la tumeur est biologiquement homogène et que le comportement des cellules cancéreuses est influencé par des facteurs extrinsèques (le microenvironnement, la réponse immunitaire) et intrinsèques (facteurs de transcription, voies de signalisation). Ces facteurs imprédictibles et aléatoires sont responsables : - de l'hétérogénéité tumorale pour l'expression de marqueurs phénotypiques ; - de l'état des cellules dans le cycle cellulaire ; - de la capacité d'initier la tumeur. Ces facteurs induisant des changements non permanents, les cellules tumorales sont malléables et peuvent passer d'un état à un autre.
- le modèle hiérarchique postule que le tissu tumoral est une caricature du tissu normal avec des cellules souches tumorales capables de s'autorenouveler et d'entretenir la tumeur, mais aussi capables de s'engager dans des processus de

prolifération, et de différenciation en cellules qui constituent la majorité de la masse tumorale mais qui ont perdu la capacité de générer la maladie.

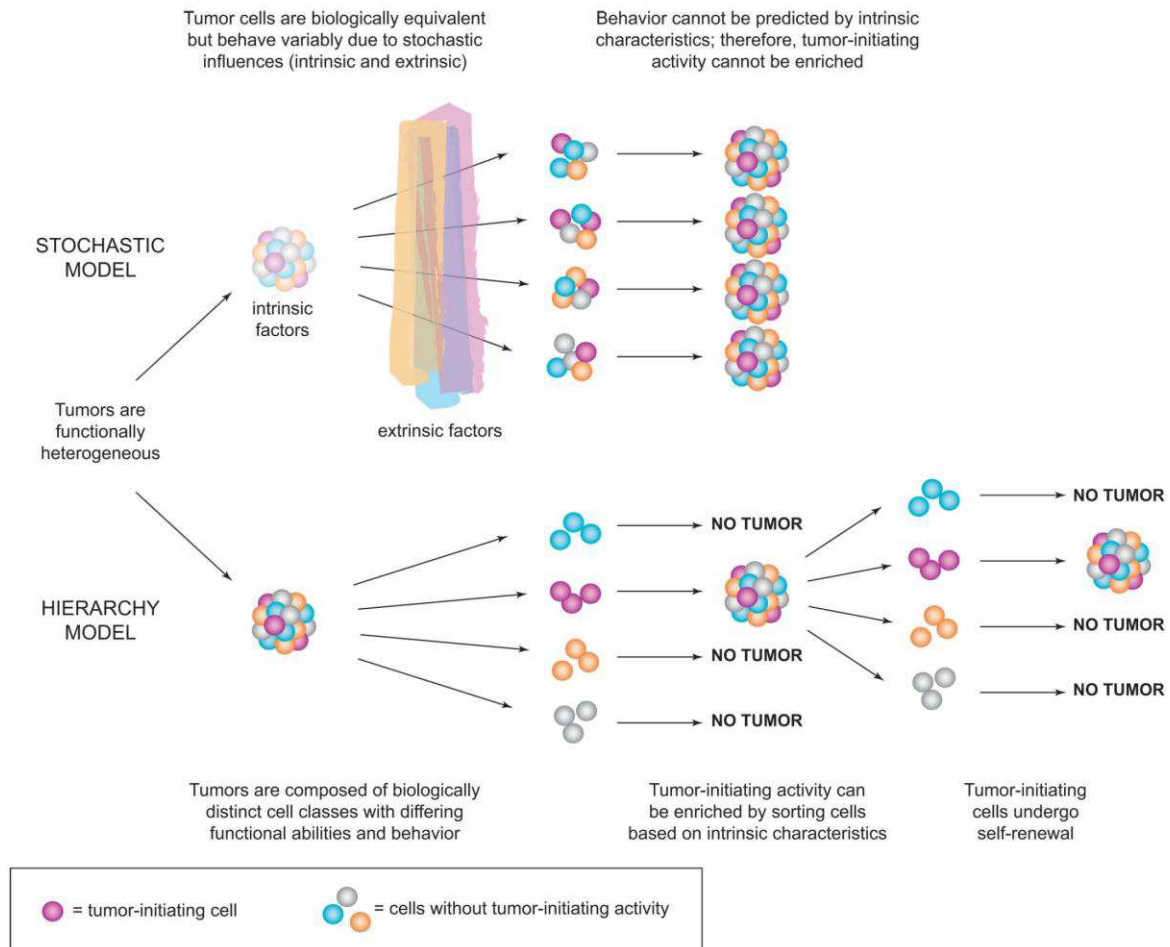


Figure 7 : Modèle stochastique et hiérarchique expliquant l'hétérogénéité tumorale (Dick, 2008)

Trois avancées techniques importantes ont révolutionné l'étude des cellules souches humaines normales ou leucémiques. La première est le développement des anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes de surface ; la deuxième est le développement du « Fluorescence-Activated Cell Sorting » (FACS), l'association des deux ayant permis le fractionnement de populations cellulaires distinctes avec un niveau de pureté élevé; la troisième est le développement des xénogreffes de cellules humaines normales ou leucémiques qui ont permis l'identification fonctionnelle des cellules souches (Dick, 2008).

Après avoir transplanté avec succès des cellules pré-B de LAL dans le modèle de souris NOD/SCID (Kamel-Reid et al., 1989), l'équipe de John Dick s'intéresse aux LAM (Leucémies Aigües Myeloblastiques). En effet, des études *in vitro* réalisées avec des blastes de LAM avaient mis en évidence une population minoritaire de Colony-Forming Units (CFU ; 1% des blastes) générant des colonies blastiques et capables d'autorenouvellement (Dick, 2008).

Dans les années 1990, l'équipe de John Dick identifie et caractérise pour la première fois une sous-population rare de cellules souches leucémiques appelées « SCID Leukemia-initiating Cells » (SL-IC), présente dans tous les types de LAM (classification FAB). La fréquence des SL-IC est très variable (0,2 à 100 SL-IC pour  $10^6$  blastes) et ne corrèle ni avec le sous-type FAB, ni avec le nombre de blastes CD34<sup>+</sup> présents chez le donneur. Les SL-IC sont capables d'initier chez les souris NOD/SCID xéno greffées une LAM humaine identique à celle du donneur. Elles sont capables de proliférer, de se différencier partiellement et surtout de s'autorenouveler (expériences de transplantations en série). Sur des critères phénotypiques et fonctionnels (génération de CFU leucémiques), l'équipe de J. Dick met en évidence une organisation hiérarchisée de la population blastique des LAM, les SL-IC ayant un phénotype CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, proche de celui des CSH normales. A partir de ces résultats, ils émettent l'hypothèse qu'une mutation d'une cellule souche pourrait entraîner la formation d'une SL-IC responsable de l'émergence de la leucémie (Bonnet and Dick, 1997; Lapidot et al., 1994). Le terme Cellules Souches Leucémiques (CSL) remplacera très rapidement le terme SL-IC.

Depuis, la recherche sur les CSL dans les hémopathies malignes n'a cessé de croître. Dans les LAM, d'autres équipes ont confirmé la présence de CSL mais avec quelques différences dans la caractérisation comme par exemple la fréquence, le profil phénotypique et la cellule normale d'origine (Ailles et al., 1999; Hosen et al., 2007; Sarry et al., 2011; Somervaille and Cleary, 2006; Taussig et al., 2010).

Dans les tumeurs solides, l'existence des cellules souches cancéreuses reste encore plus controversée (Rosen and Jordan, 2009). Elle a été démontrée dans les cancers du sein, du colon et du cerveau (Al-Hajj et al., 2003; O'Brien et al., 2007; Singh et al., 2004) mais des études avec des cellules de mélanome montrent au contraire que toutes les cellules ont

des capacités de xénogreffe illimitées et sont donc fonctionnellement des cellules souches (Quintana et al., 2010).

### 2.1.2 Définition d'une cellule souche cancéreuse

En 2006, lors d'un « WorkShop » de l' « American Association for the Cancer Research », une définition consensuelle de la cellule souche cancéreuse a été proposée (Clarke et al., 2006).

Une cellule souche tumorale est définie par : - sa capacité d'autorenewement; - sa capacité à proliférer et à se différencier dans tous les types cellulaires de la tumeur initiale ; - sa capacité à xénogreffer et à reproduire, à long terme, une tumeur identique chez l'animal.

## 2.2 Les cellules souches leucémiques (CSL) dans les LAL-B

La mise en évidence des CSL dans les LAL-B faisant intervenir des critères phénotypiques, la figure 8 rappelle l'expression de quelques antigènes de surface aux différents stades de la lymphopoïèse B normale.

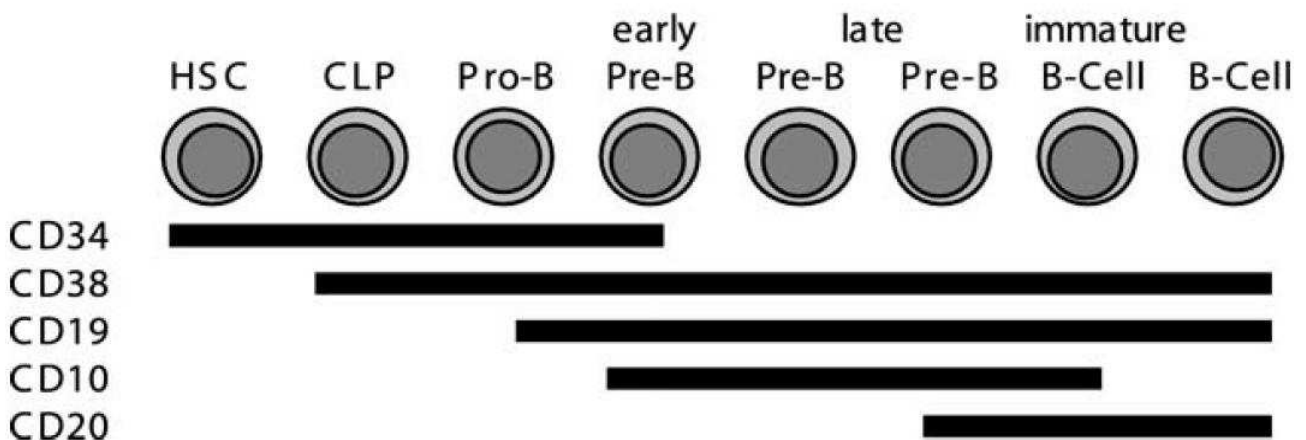


Figure 8 : Expression des marqueurs de surface dans la lymphopoïèse B normale (Bernt and Armstrong, 2009)

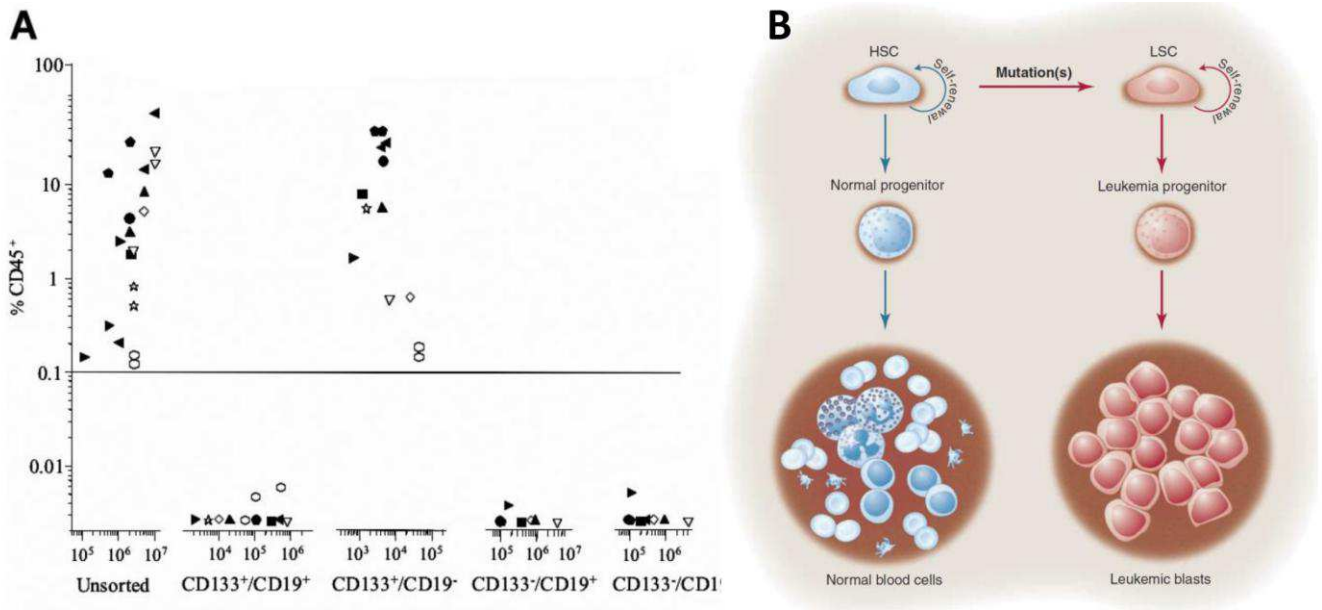
### 2.2.1 Un phénotype de cellule souche hématopoïétique

Bien évidemment, l'engouement de la fin du XX<sup>ème</sup> siècle pour la recherche de CSL n'a pas épargné les LAL. Les premiers travaux caractérisant phénotypiquement ces cellules souches sont publiés en 2000. Les auteurs reproduisent la méthodologie des travaux de

l'équipe de John Dick dans le modèle LAL BCR-ABL (7 patients). Ils mettent en évidence par des expériences de xéno greffes en série, la présence de CSL exclusivement  $CD34^{high}CD38^{-}$  : - capables de s'autorenouveler, proliférer et se différencier ; - à l'origine d'une tumeur organisée selon une hiérarchie ; - reproduisant à long terme une maladie similaire à la LAL initiale. Ces CSL sont rares (faible fréquence de 0,2 à 41 CSL par  $10^6$  cellules) et ne corrélient ni avec le nombre de  $CD34^{+}$  du donneur, ni avec le sous-type de LAL FAB (Cobaleda et al., 2000). Ces résultats seront confirmés pour d'autres types de LAL dont des leucémies ETV6-RUNX1, par une autre équipe qui identifie des CSL dans la population minoritaire  $CD34^{+}CD38^{-}CD10^{-}CD19^{-}$  (Cox et al., 2004). Ces CSL sont capables chez l'animal de reproduire une leucémie hétérogène exprimant les marqueurs de différenciation CD10, CD19 et CD22.

Le CD133 ayant été rapporté comme un marqueur des cellules souches cancéreuses résistantes aux thérapies (Liu et al., 2006), et étant exprimé par des cellules souches hématopoïétiques dont celles contenant des aberrations chromosomiques (Toren et al., 2005), Cox *et al.* montrent qu'il peut être aussi utilisé comme marqueur des CSL dans des LAL préB et BCR-ABL. Les CSL, présentes uniquement dans une fraction minoritaire  $CD133^{+}CD38^{-}CD19^{-}$  (figure 9A), résistent *in vitro* à la vincristine et à la dexaméthasone et conservent après traitement une capacité de prolifération *in vitro* à long terme (Cox et al., 2009).

Les auteurs de ces articles suggèrent au regard du phénotype des CSL, que la transformation leucémique pourrait avoir lieu au niveau de cellules normales hématopoïétiques très primitives voire souches (figure 9B).



**Figure 9 : A, Analyse du chimérisme médullaire de souris NOD/SCID transplantées avec les cellules de 10 patients pédiatriques préalablement triées selon l'expression de deux marqueurs phénotypiques (CD133 et CD19).** Chaque patient est représenté par un symbole différent (Cox et al., 2009). **B, Modèle de transformation leucémique d'une cellule souche normale** (Rosen and Jordan, 2009).

### 2.2.2 Un phénotype de progéniteur hématopoïétique

Sans que l'existence des CSL ne soit remise en cause, plusieurs études contestent le phénotype décrit dans les travaux précédents. Dans leur étude portant sur des échantillons de patients atteints de LAL-B de type ETV6-RUNX1 et BCR-ABL1 (isoformes P190 et P210), Castor *et al.* montrent que dans les populations CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, seule la sous population minoritaire CD19<sup>+</sup> (la plus engagée pour la lymphopoïèse B normale) contient des CSL (greffe en série dans des souris NOD/SCID). Ils montrent aussi que l'anomalie cytogénétique P210 BCR-ABL1 est retrouvée en FISH dans la fraction CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup> et dans la lignée myéloïde des échantillons de patient, ce qui n'est pas le cas pour les échantillons ETV6-RUNX1 et P190 BCR-ABL1 positifs. Ils suggèrent donc que les événements mutationnels peuvent toucher - un progéniteur B engagé dans les LAL-B ETV6-RUNX1 et P190 BCR-ABL1 positifs ; - une cellule souche dans les LAL P210 BCR-ABL1 positives (Castor et al., 2005) (figure 10).



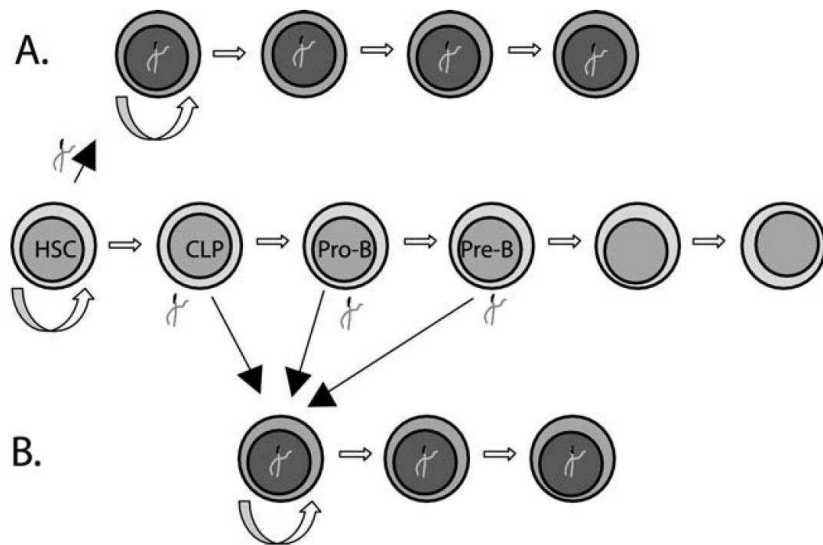


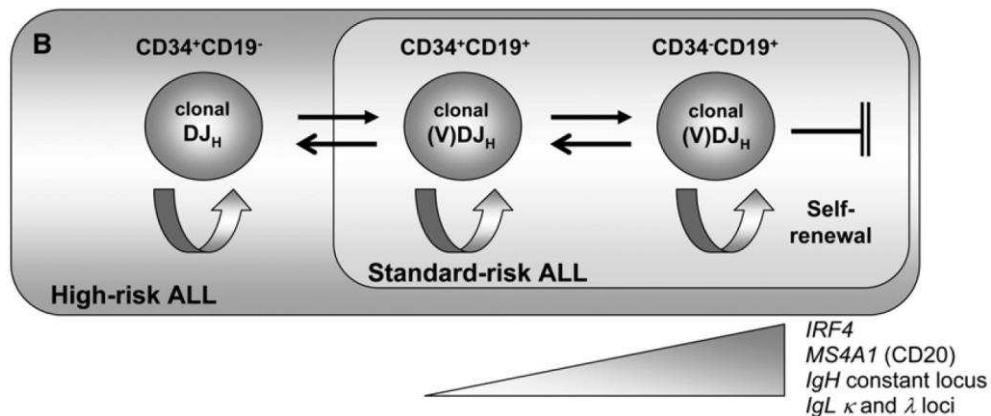
Figure 10 : Modèle de transformation leucémique proposé par Castor et al.: A, pour les LAL P210 BCR-ABL positives la cellule d'origine est une cellule souche normale; B, pour les LAL P190 BCR-ABL et ETV6-RUNX1 positives, la cellule d'origine est un progéniteur engagé (CLP, Pro-B ou Pré-B) (Bernt and Armstrong, 2009)

Ces résultats sur l'origine de la cellule acquérant la mutation ETV6-RUNX1 génératrice de LAL sont étoffés par une étude réalisée avec des échantillons de cellules de jumelles monochorioniques (une seule enfant malade). Chez la patiente, la présence de CSL dans la population  $CD34^+CD38^-CD19^+$  ETV6-RUNX1 positive est confirmée par transplantation en série. La sœur non atteinte présente dans le sang périphérique : - une population aberrante  $CD34^+CD38^-CD19^+$  ETV6-RUNX1 positive, minoritaire, stable dans le temps et moins engagée en différenciation (étude en PCR du réarrangement des locus d'IgH) ; - des cellules  $CD38^+$  (engagées) et  $CD19^-$  (multipotentes) ETV6-RUNX1 négatives. Complétant les résultats de Castor *et al.*, cette étude décrit des CSL (ETV6-RUNX1 positives) issues d'une population  $CD34^+CD38^-CD19^+$  dite « préleucémique » ancestrale, non maligne, capable de s'autorenouveler et correspondant à celle décrite chez la sœur non atteinte de LAL (Hong et al., 2008).

Kong rajoute un peu de complexité à ces caractérisations phénotypiques en montrant la présence de CSL dans la fraction  $CD34^+CD19^+$  indépendamment de l'expression du CD38, chez des patients atteints de LAL pré-B (Kong et al., 2008).

### 2.2.3 La CSL unique et le modèle hiérarchique existent-ils dans les LAL-B ?

A la fin des années 2000, le développement pour la xénogreffe de nouvelles souches de souris immunodéficientes (souris NSG) et d'une technique de transplantation intra-fémorale ont permis des études contredisant les résultats décrits précédemment. Ces travaux montrent que quel que soit le type de LAL-B, toutes les sous populations cellulaires triées selon les marqueurs phénotypiques  $CD34^{+/-}CD19^{+/-}$ ,  $CD10^{+/-}$  ou  $CD20^{+/-}$  sont capables d'induire des leucémies phénotypiquement identiques à la tumeur d'origine après transplantation à des souris NSG. La reconstitution de sous populations primitives à partir de sous-populations considérées comme plus engagées, selon des critères phénotypiques ( $CD34^{-}CD19^{+}$ ) et moléculaires (« upregulation » du facteur de transcription IRF4 qui rend les loci des chaînes légères d'immunoglobulines accessibles), révèle une malléabilité cellulaire et une évolution clonale (figure 11) qui ne coïncident pas avec le concept d'un système hiérarchisé à partir de cellules souches (Rehe et al., 2013; le Viseur et al., 2008). La malléabilité se distingue de la plasticité, terme employé pour qualifier des blastes capables de se transdifférencier dans une autre lignée comme la lignée myéloïde par exemple (Vormoor, 2009).



**Figure 11 : Malléabilité et autorenouveaulement des blastes dans les LAL de haut risque ou de risque standard** (le Viseur et al., 2008).

La fréquence élevée et similaire de « CSL » dans les différentes sous-populations (de 1:40 à 1:2900) ; qui est rapportée aussi par Krivtsov et al., 2006; Morisot et al., 2010; Schmitz et al., 2011 suggèrent un modèle stochastique de leucémogénèse avec une évolution clonale dans les LAL-B (figure 7).

### **2.3 CIL, un nom plus approprié**

Bien que la cellule souche cancéreuse soit clairement définie (confer paragraphe 2.1.2.), il persiste dans la littérature une confusion sémantique pour la CSL souvent considérée comme issue d'une cellule souche hématopoïétique normale et à l'origine d'une population leucémique se développant selon un modèle hiérarchisé.

Ce concept est démontré expérimentalement dans les LAM mais reste très discuté et probablement inadapté dans les LAL et ce, quel que soit le modèle retenu, stochastique ou hiérarchique. La présence d'une population de CSL à fréquence élevée ayant comme origine des cellules engagées étant probable dans les LAL, le terme de CIL (Cellule Initiatrice de Leucémie), de plus en plus utilisé dans la littérature à la place de CSL, sera privilégié dans ce document.

### **2.4 Conclusion**

En dépit des travaux publiés, l'identification des CIL dans les LAL sur des critères phénotypiques reste une question non résolue, faute de preuves expérimentales irréfutables. Les observations contradictoires depuis plus de 10 ans peuvent être expliquées par les différences entre les modèles de souris employées et les protocoles de transplantation utilisés. Quel que soit le modèle de leucémogénèse (stochastique ou hiérarchique) ou la cellule à l'origine de la leucémie (cellule souche ou progéniteur), l'hétérogénéité des populations leucémiques et l'existence de plusieurs états de différenciation (sur des critères phénotypiques et moléculaires) font consensus.

Les CSH normales sont capables de se protéger de multiples agressions extérieures par divers mécanismes souvent complémentaires et synergiques comme l'expression de pompes de transport (ABCG2 par exemple) ou la quiescence qui permettent respectivement l'efflux de toxines xénobiotiques et le confinement dans un microenvironnement cellulaire, matriciel et vasculaire très particulier et protecteur.

Si l'on en revient à l'objectif d'éradication de la maladie mentionnée au début de ce chapitre, une des questions importantes à résoudre est celle des mécanismes protégeant les CIL des chimiothérapies. Peuvent-ils être en partie ou totalement identiques à ceux mis en place par les CSH ?

### 3 Dormance tumorale et dormance cellulaire/quiescence

Certains patients rechutent tardivement (figure 12) alors que la rémission de la maladie semble complète (MRD <0,01% ; cf paragraphe 1.2.4).



Figure 12 : Délai de la rechute après traitement (Aguirre-Ghiso, 2007).

Les mécanismes de dormance tumorale sont divers et expliquent pour partie la latence variable entre la rémission complète (MRD<0,01%) et la rechute (Aguirre-Ghiso, 2007).

#### 3.1 Dormance de la masse tumorale

Cet équilibre intervient lors d'un défaut de vascularisation de la tumeur (dormance angiogénique) ou lorsque le système immunitaire de l'hôte contient la tumeur (immunosurveillance). Les mécanismes pro-apoptotiques contrebalancent alors la prolifération des cellules tumorales.

##### 3.1.1 La dormance angiogénique

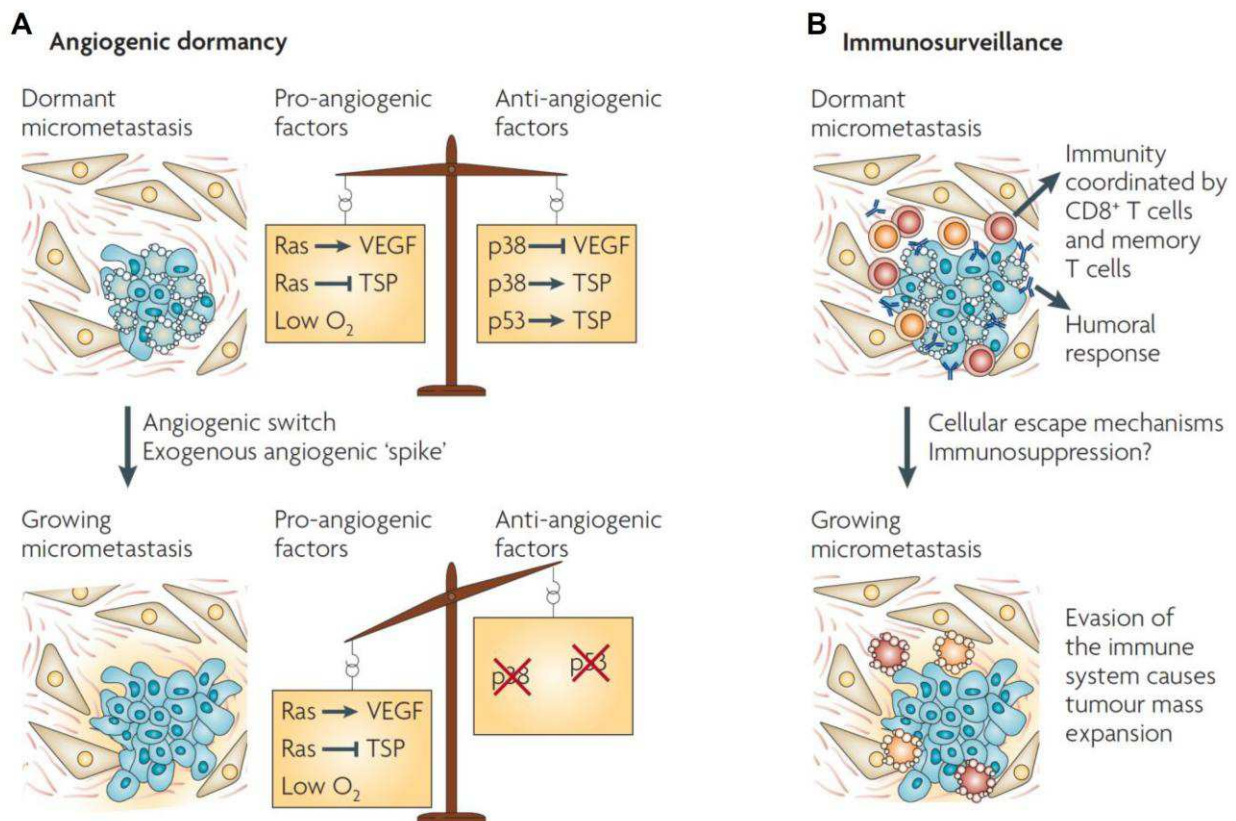
La progression tumorale dépend de la disponibilité des nutriments et de l'oxygène amenés par la vascularisation normale de l'hôte. Lorsque ceux-ci deviennent insuffisants, la fraction des cellules apoptotiques égale celle des cellules proliférantes. La masse tumorale est dite en dormance angiogénique (figure 13 A).

La capacité des cellules tumorales à répondre à certains signaux comme la faible tension d'oxygène, pour promouvoir une néo-vascularisation en interrompant la dormance tumorale est appelée le « switch angiogénique » (Bergers and Benjamin, 2003; Naumov et al., 2006). Le switch angiogénique est contrôlé par une balance entre les facteurs pro-angiogéniques tel que le « Vascular Endothelial Growth Factor » (VEGF) (Schmidt and

Carmeliet, 2011) et les facteurs anti-angiogéniques tel que la Thrombospondin (TSP) (Almog et al., 2009). L'induction du VEGF et la répression de la TSP par la voie Ras sont contrebalancés par la kinase p38 et le suppresseur de tumeur p53 (Giuriato et al., 2006; Okajima and Thorgeirsson, 2000). La perte de fonction d'une de ces deux dernières protéines entraîne un « Switch angiogénique » qui interrompt la dormance angiogénique (figure 13A) (Aguirre-Ghiso, 2007).

### 3.1.2 L'immunosurveillance

L'implication du système immunitaire dans le contrôle des tumeurs est connu depuis 35 ans (Weinhold et al., 1979). Lors de la cancérogénèse, le système immunitaire intervient rapidement et tente d'éliminer les cellules malignes. Pour des raisons méconnues, certaines cellules persistent, continuent à proliférer et un état d'équilibre peut être atteint entre cellules éliminées par le système immunitaire et cellules proliférantes. Ce phénomène participe à la dormance de la masse tumorale (figure 13 B) (Teng et al., 2008).



**Figure 13 : Mécanismes impliqués dans la dormance de la masse tumorale. A, la dormance angiogénique ; B, l'immunosurveillance (Aguirre-Ghiso, 2007).**

Les cellules majoritairement impliquées dans cette réponse immunitaire sont les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques. Il a été montré que ces lymphocytes ciblaient uniquement les cellules tumorales exprimant fortement la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) alors que celles qui ne l'expriment que faiblement sont ignorées et restent dans un état de quiescence (Kmieciak et al., 2013). Plusieurs études ont révélé l'implication de la réponse humorale (faisant intervenir des anticorps anti-idiotypiques) (Rabinovsky et al., 2007) et de la réponse innée dans la dormance tumorale (par l'intermédiaire de l'IFN- $\gamma$  et des cellules NK) (O'Sullivan et al., 2012).

Les mécanismes d'échappement de la tumeur au système immunitaire restent méconnus. Quelques études mettent en cause une déplétion en lymphocytes T ou en IFN- $\gamma$  (Quesnel, 2013) ou des réarrangements phénotypiques (Kmieciak et al., 2013).

### **3.2 La dormance cellulaire ou la quiescence**

Dans la dormance cellulaire tumorale, le cycle cellulaire des cellules cancéreuses est arrêté en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> bloquant ainsi leur prolifération. Dans la littérature, elle est fréquemment rapportée pour les cellules cancéreuses métastatiques en réponse au stress du à l'environnement hostile du tissu non-orthotopique (comme les sites sanctuaires ; cf paragraphe 1.3). Les cellules sont réactivées lorsque l'environnement devient plus propice (génération d'une niche tumorale par exemple) (Kaplan et al., 2006; Wicha, 2006). L'étude de l'expression de marqueurs de prolifération comme le Ki67, montre que la quiescence participe à la dormance cellulaire (Aguirre-Ghiso, 2007).

Les cellules dormantes responsables des rechutes sont des cellules initiateurs de cancers qui présentent certaines propriétés des cellules souches normales et qui utilisent les mêmes voies de signalisation induisant la quiescence.

### 3.2.1 La quiescence des cellules souches

Une des caractéristiques des cellules souches normales est de pouvoir alterner de longues phases de quiescence et des phases plus courtes de prolifération (Li and Clevers, 2010).

#### 3.2.1.1 Quiescence et phase G<sub>0</sub> du cycle cellulaire

La phase G<sub>0</sub> est une phase du cycle cellulaire accessible uniquement aux cellules en phase G<sub>1</sub> n'ayant pas passé le point de restriction (R-point). Les cellules qui entrent en phase G<sub>0</sub> le font de manière : - irréversible lorsqu'elles deviennent sénescentes ou entrent en différenciation terminale ; - réversible ce qui est le cas de la majorité des types de cellules souches. Les cellules souches peuvent revenir dans les phases actives du cycle et se remettre à proliférer (figure 14) (Cheung and Rando, 2013) en réponse à des stimuli extrinsèques.

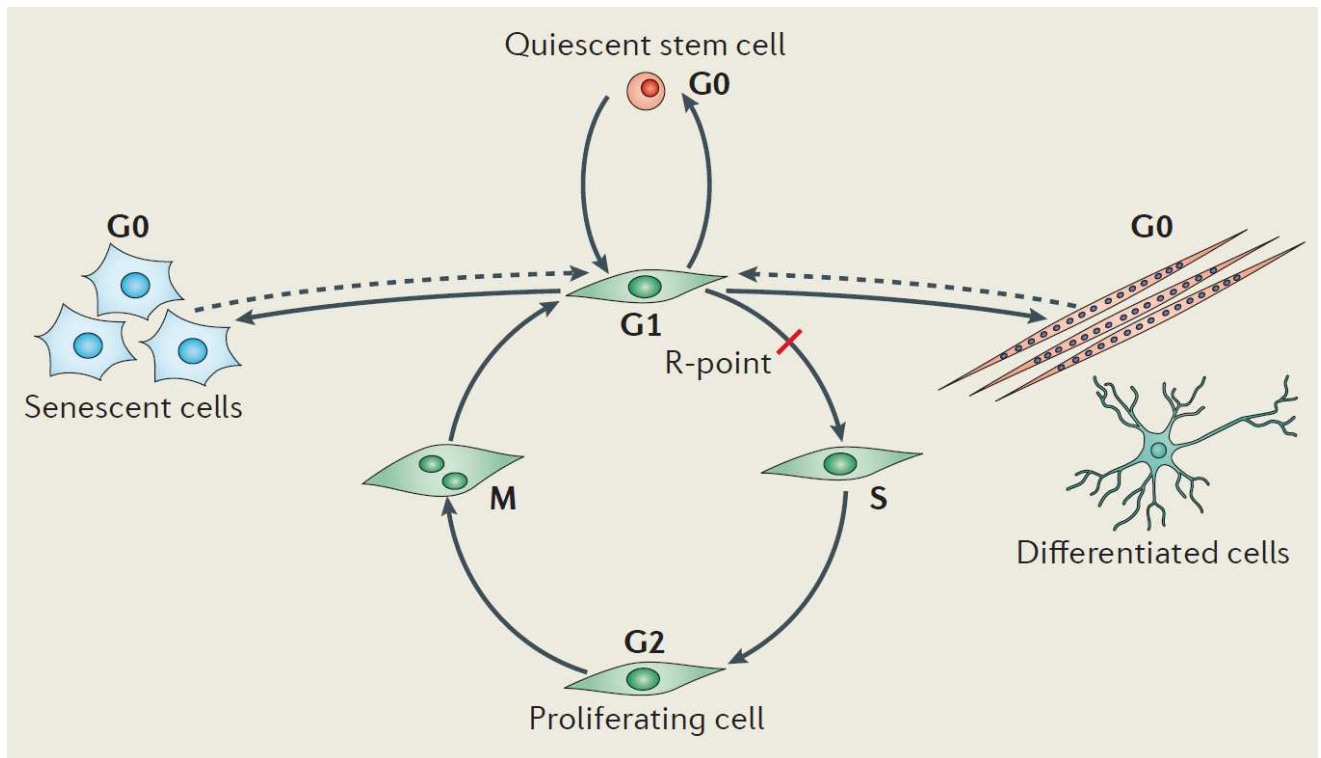


Figure 14 : Réversibilité de la phase G<sub>0</sub> du cycle cellulaire (Cheung and Rando, 2013).

### **3.2.1.2 Identification par CMF des cellules quiescentes**

Les cellules quiescentes ne se divisant plus et ayant un métabolisme ralenti (Stuart and Brown, 2006) peuvent être identifiées par plusieurs critères :

- leur faible taux d'ARN (Hüttmann et al., 2001). La méthyltransferase « Enhancer Of Zeste Homolog 1 (EZH1) surexprimée dans les cellules quiescentes, régule négativement la transcription en triméthylant les histone H3 (Bernstein et al., 2007).
- la perte de marqueurs nucléaires/chromatiniens de prolifération comme le Ki67 (Bullwinkel et al., 2006).
- la rétention de colorants lipophiles comme le DiD, dilué par deux après chaque mitose.
- L'absence d'incorporation nucléaire de molécules analogues d'acides nucléiques durant la phase S de réplication de l'ADN comme le 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU ; un équivalent du 5'-bromo-2'-deoxyuridine) (Buck et al., 2008).

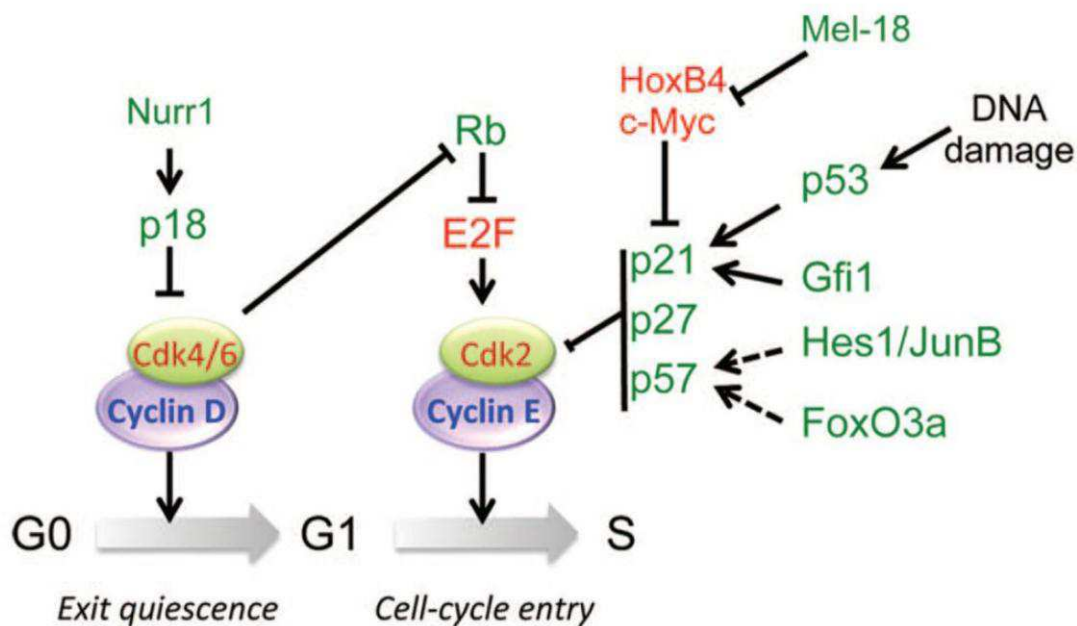
### **3.2.1.3 Régulation « intrinsèque » de la quiescence**

- ✓ La régulation de la quiescence par les « Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor » (CKI)

Pendant le cycle cellulaire, les transitions de phase sont sous l'étroit contrôle de cyclines associées à des kinases (Cycline/CDK). L'activité des complexes Cyclin/CDK est elle-même contrôlée par des inhibiteurs, les CKI. Les CKI sont regroupés en deux familles, les INK (p15, p16, p18 et p19) et les CIP/KIP (p21, p27 et p57).

Tous les inhibiteurs de la famille CIP/KIP sont impliqués dans la quiescence. La double délétion de p27 et p57, l'inhibition de p21 et/ou de p57 entraînent une diminution du pool de CSH quiescentes (Cheng et al., 2000; Matsumoto et al., 2011; Zou et al., 2011). Il a été montré que certaines CKI de la famille des INK comme p18, pouvaient intervenir dans la régulation de la quiescence, sa suppression induit l'autorenouvellement des CSH (Yuan et al., 2004) (figure 15).





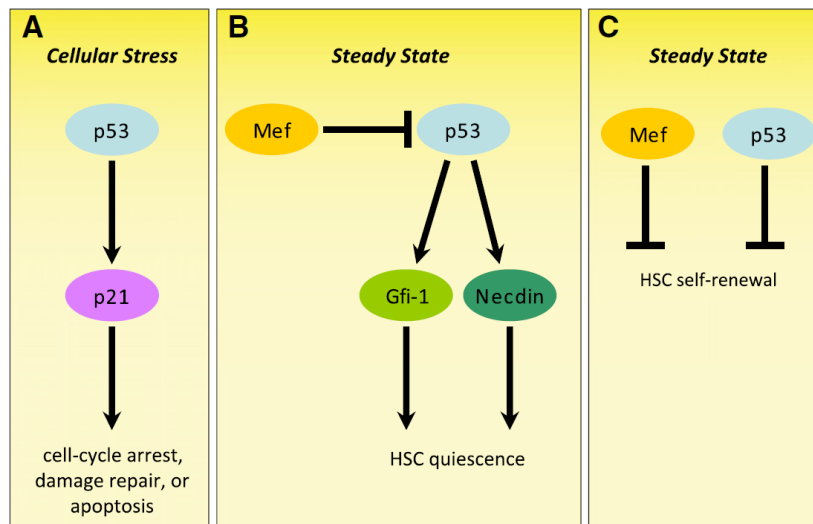
**Figure 15 : Régulateurs intrinsèques impliqués dans la sortie de quiescence des CSH murines.** Les activateurs de la quiescence sont représentés en vert, les inhibiteurs en rouge (Yamada et al., 2013).

✓ Les facteurs de transcription

Les facteurs de transcription de la famille « E2 Factor » (E2F) sont des acteurs essentiels à la transition entre la phase G<sub>1</sub> et S (DeGregori and Johnson, 2006). Leur activité est réprimée par les co-facteurs de transcription « pocket protein », au nombre de trois : p107, p130 et pRb (Retinoblastoma). Le triple KO conditionnel pour ces trois protéines entraîne une perte du pool des CSH murines (Viatour et al., 2008). En quiescence, pRb est majoritairement hypophosphorylé (Guitart et al., 2011; Kops et al., 2002), p130 est surexprimé (Kops et al., 2002). Le rôle de p107 reste méconnu dans le système hématopoïétique, si ce n'est que son expression rétablit le pool des CSH dans le triple KO murin (Viatour et al., 2008).

Le suppresseur de tumeur p53 dont le gène est le plus muté dans les cancers humains, est un des acteurs majeurs de la quiescence. Indépendamment de son rôle dans la réponse au stress cellulaire passant par p21, sa délétion entraîne une diminution du pool des CSH (Liu et al., 2009) qui normalement exprime fortement son transcrit (Dumble et al., 2007). p53 cible et active Gfi-1 (Growth factor independent -1) et Necdin (figure 16 B et C).

- Gfi-1 est un répresseur transcriptionnel qui préserve l'intégrité fonctionnelle des CSH et restreint la prolifération (Hock et al., 2004; Zeng et al., 2004).
- Necdin est un répresseur de croissance (Taniura et al., 2005). Il est connu pour être hautement exprimé dans les CSH, son expression est corrélée avec la quiescence des CSH (Liu et al., 2009).



**Figure 16 : Rôles de p53 dans la réponse au stress cellulaire (A), dans la quiescence (B) et l'autorenouvellement (C) des CSH** (van Os et al., 2009).

La régulation de p53 est liée au facteur de transcription MEF (nommé aussi ELF4) (Liu et al., 2009) qui régule négativement l'entrée en quiescence. Il a été montré chez des souris *Mef*<sup>-/-</sup> une augmentation du pool des CSH (Lacorazza et al., 2006).

✓ Régulation post-transcriptionnelle

Régulation post-transcriptionnelle par les micro ARN (miR) : Dans les CSH, le miR-126 régule de multiples acteurs de la voie PI3K/AKT/GSK3 $\beta$  atténuant la réponse à des stimuli extrinsèques comme le « Stem Cell Factor » (SCF). La surexpression de miR-126 augmente le pool de CSH quiescentes (Lechman et al., 2012).

✓ Autres voies de régulation de la quiescence

Plusieurs autres facteurs de transcription régulent l'entrée en quiescence. Ils sont énumérés dans le tableau 7 (Yamada et al., 2013).

Category	Gene	Control of quiescence	Mouse model
Cell cycle	p21	Positive	-/-
	p27		-/-
	p18		-/-
	p57		cKO (Mx1-cre)
	Rb/p107/p130		cKO (Mx1-cre, Rosa26-cre ERT2)
	CyclinD1/D2/D3	Negative	-/-
	Cdk4/6		-/-
Transcription factor	JunB	Positive	cKO (MORE-cre)
	Pbx1		-/-, cKO (Mx1-cre, Tie2-cre)
	FoxO1/3/4		cKO (Mx1-cre)
	FoxO3a		-/-
	Nurr1		Retroviral-transduction
	Scl		+/-
	p53		-/-
	Necdin		-/-
	Egr1		-/-
	ELF4		-/-
	AML1/Runx1	Negative	cKO (Mx1-cre)
	Stat5		cKO (Mx1-cre)
Other	Fbw7	Positive	cKO (Mx1-cre), Retroviral expression
	Lkb1		cKO (Mx1-cre, Rosa26-cre ERT2)
	Tsc1-mTOR		cKO (Mx1-cre)
	Cited2		cKO (Mx1-cre)
	Txnip		-/-
	Atm		-/-
	Mi-2 $\beta$		cKO (Mx1-cre)
	Paf		-/-
	Ott1		cKO (Mx1-cre)
	G0S2		Retroviral expression and silencing
	Akt1/2		Negative
	Lnk	-/-	

**Tableau 7 : Liste non exhaustive des régulateurs « intrinsèques » impliqués dans la quiescence des CSH murines (Yamada et al., 2013).**

### 3.2.2 Mécanismes de survie des cellules quiescentes

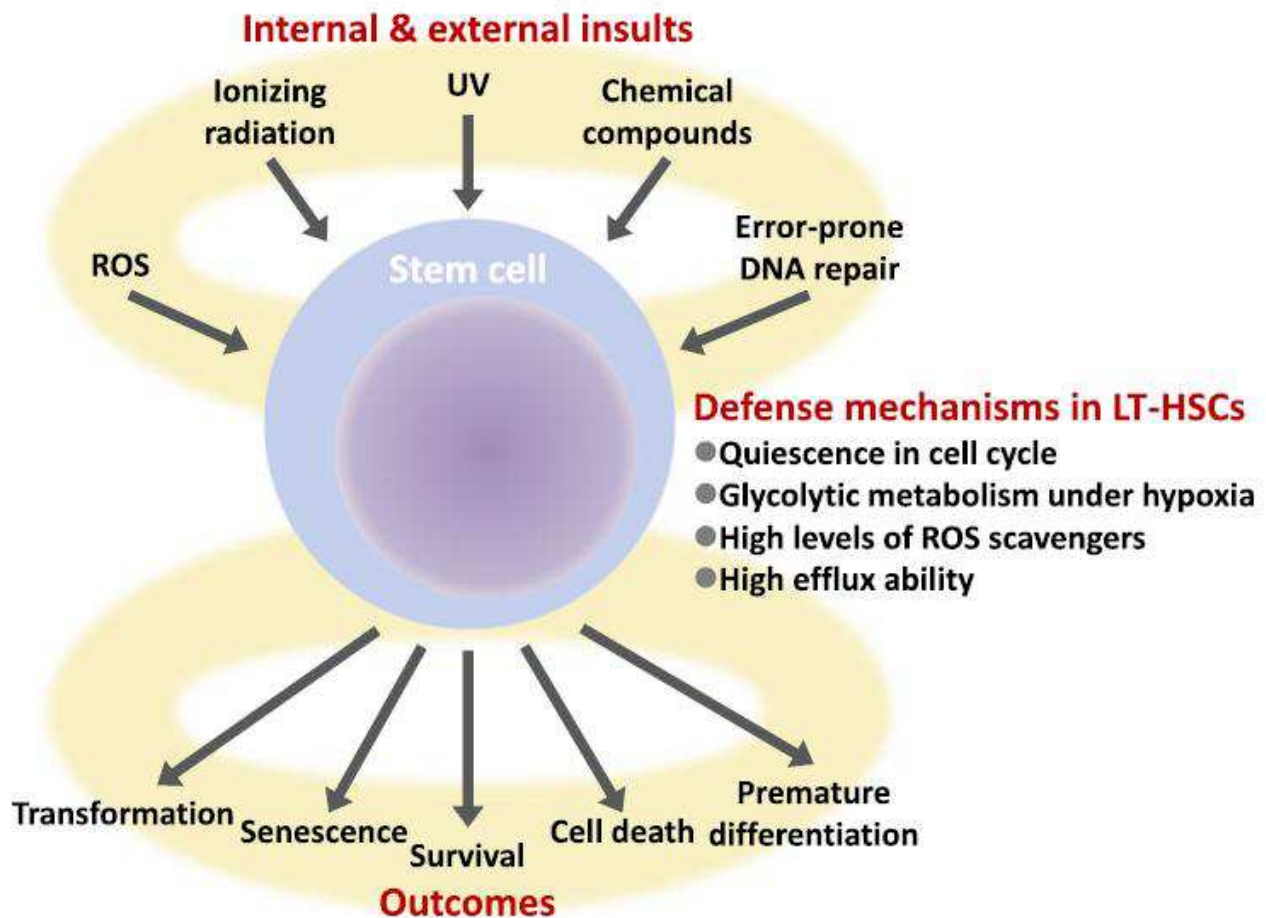


Figure 17 : Mécanismes de défense des CSH (Suda et al., 2011)

Face aux agressions extérieures (UV, Agents chimiques ...) qui ciblent les phases S ou M du cycle cellulaire, les cellules quiescentes sont mieux protégées que les cellules en cycle actif. Le maintien de l'intégrité des cellules souches quiescentes tout au long de la vie d'un individu dépend de mécanismes de survie performants (figure 17) comme :

- Les facteurs de transcription de la famille « Forkhead box O » (FoxO) qui permettent le maintien en quiescence des Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) face au stress environnemental, qui amènent à une accumulation cellulaire de « Reactive Oxygen Species » (ROS) toxiques pour les cellules (Tothova et al., 2007).
- Les pompes d'efflux de drogues tels que les transporteurs ATP-dépendants ABCG2 qui évacuent les composés toxiques accumulés par les cellules (Challen and Little, 2006)

## *Introduction – Dormance et quiescence*

- L'autophagie qui permet le recyclage des composants endommagés et qui est rapporté comme essentiel au maintien de la quiescence (Mortensen et al., 2011).

Un des points faibles de la survie des cellules souches quiescentes réside dans les mécanismes de réparation de l'ADN. En quiescence, la voie de réparation non fiable « non-homologous end-joining (NHEJ) est préférentiellement utilisée et peut entraîner une accumulation d'anomalies (Mohrin et al., 2010). Un mécanisme compensatoire de ces mutations suggéré dans la littérature, serait la ségrégation « orientée » des chromosomes durant la mitose de la cellule souche mutée (Charville and Rando, 2011).

## **4 Rôle de l'environnement et des faibles concentrations d'oxygène dans la quiescence des CSH**

L'environnement joue un rôle essentiel dans l'entrée et le maintien en quiescence des CSH normales. Les voies de signalisation impliquées dans la quiescence étant partiellement identiques entre les CSH et les CIL qui partagent quelques propriétés fonctionnelles, nous postulons un rôle similaire du microenvironnement dans l'entrée et le maintien en quiescence des CIL.

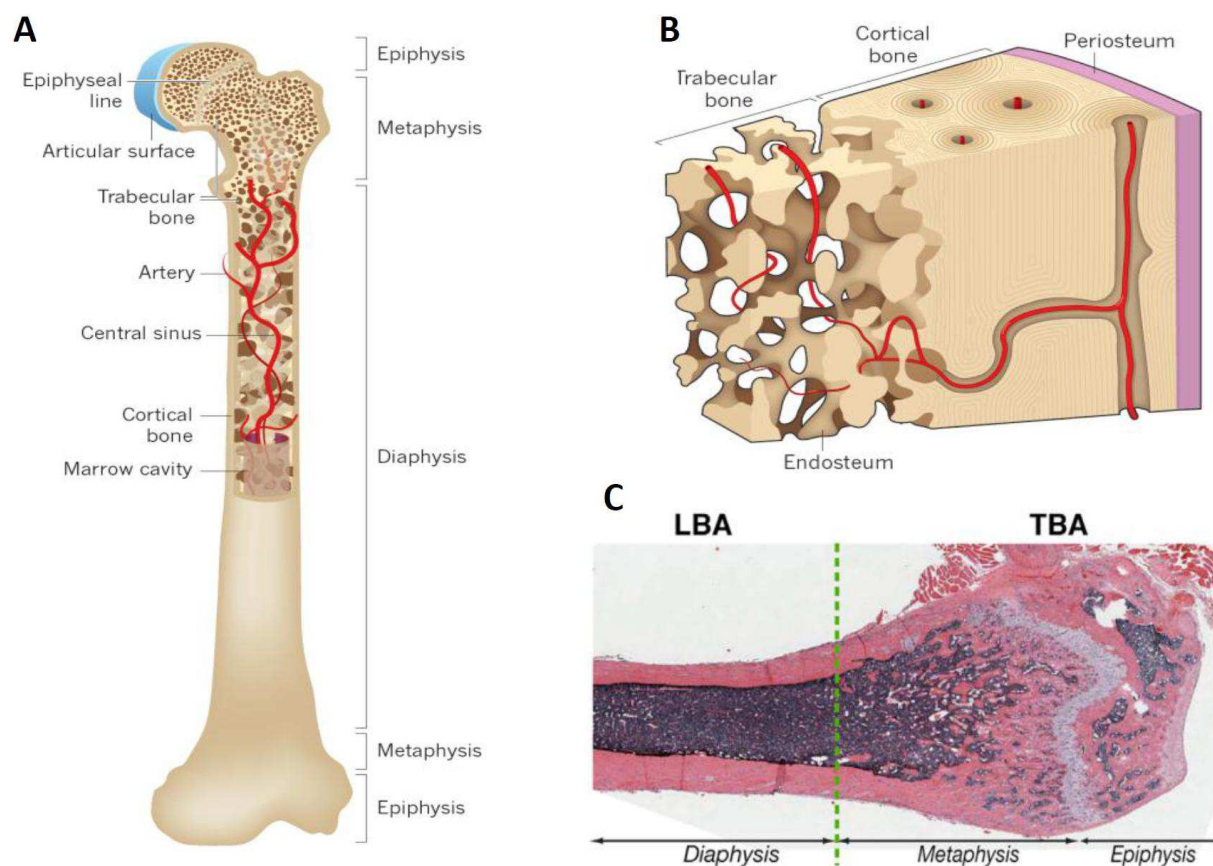
Afin de mieux comprendre les interactions possibles des CIL avec le microenvironnement, nous aborderons dans cette partie de l'introduction, l'étude de la localisation des CSH dans leur environnement normal et du rôle de cet environnement dans leur dormance (sujet très documenté dans la littérature).

### **4.1 Les CSH dans leur environnement normal**

#### ***4.1.1 L'espace médullaire***

##### **4.1.1.1 Structure osseuse**

La moelle osseuse est un tissu complexe contenant de nombreux types de cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques différentes au sein d'une trame matricielle non cellulaire vascularisée et organisée. Elle est contenue dans une enveloppe osseuse elle-même vascularisée et innervée. Un os long est divisé classiquement en 3 parties, la diaphyse, la métaphyse et l'épiphyse (figure 18 A et C). La métaphyse contient de nombreuses travées osseuses entraînant une promiscuité entre les cellules médullaires de cette région et les cellules de la surface osseuse (figure 18 B). L'interface entre l'os et la moelle osseuse est l'endoste qui est recouvert de cellules alignées « bone-lining » incluant les ostéoblastes (formation de l'os) et les ostéoclastes (résorption osseuse).

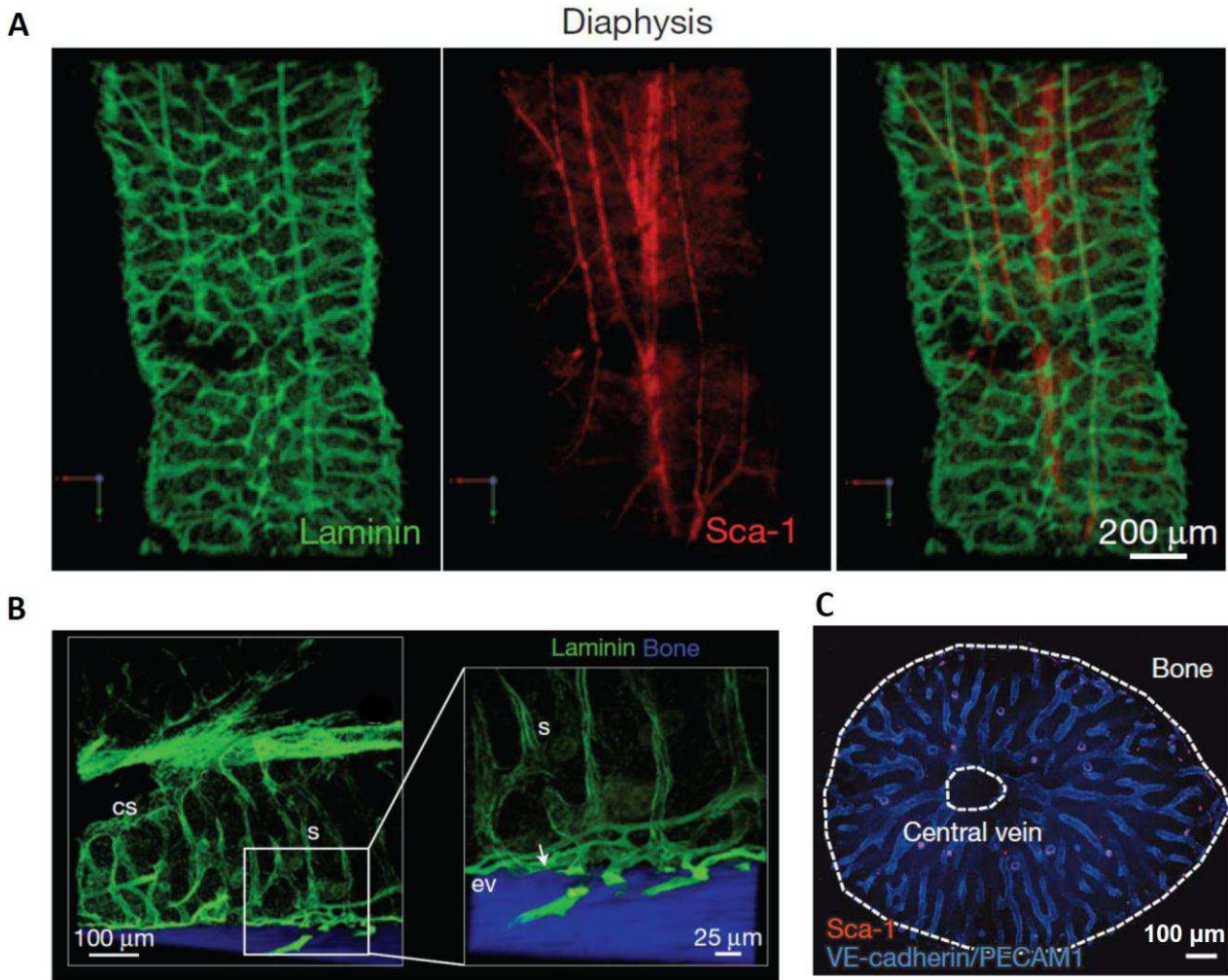


**Figure 18 : Structure de la moelle osseuse fémorale** (Guezguez et al., 2013; Morrison and Scadden, 2014) TBA : Trabecular Bone Area ; LBA : Long Bone Area

#### 4.1.1.2 Structure vasculaire

Grâce à des systèmes de reconstruction en 3D, des études ont décrit pour la diaphyse fémorale, un réseau microvasculaire très organisé où une grosse artère longitudinale centrale ( $Sca-1^+/Laminin^-$ ) donne naissance à de petites artères radiales (figure 19 A). Ces petites artères se dirigent vers l'endoste, se courbent et deviennent des artérioles ( $Sca-1^+/Laminin^+$ ) de petit diamètre (10 à 20 $\mu$ m) parcourant l'endoste. La transition entre les artérioles et la circulation veineuse s'établit le long ou à proximité de l'endoste (figure 19 B) ou les petites artérioles sont progressivement transformées en vaisseaux sinusoïdaux larges et irréguliers ( $Sca-1^-/Laminin^+/VE-cadherin^+/PECAM^+$ ) qui forment de fréquentes anastomoses et se rejoignent dans un sinus veineux central (figure 19 B et C) (Nombela-Arrieta et al., 2013). Les sinusoïdes sont des veinules spécialisées qui forment un réseau réticulaire de vaisseaux fenêtrés qui permettent aux cellules et à de nombreuses molécules de passer en dedans ou en dehors de la circulation (Morrison and Scadden, 2014).





**Figure 19 : Structure vasculaire de la moelle osseuse fémorale** (Kunisaki et al., 2013; Nombela-Arrieta et al., 2013) :

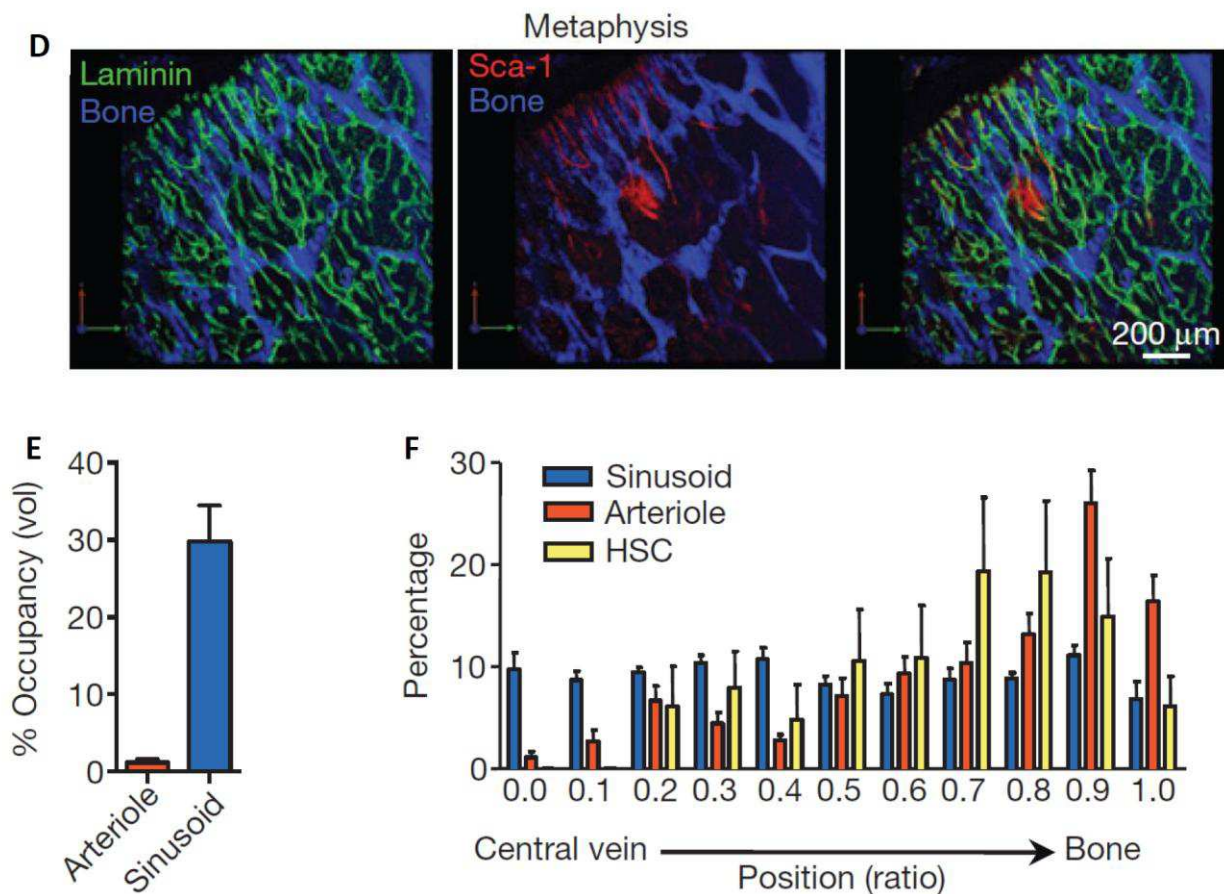
- A, reconstruction 3D de la diaphyse fémorale (coupe longitudinale) : les vaisseaux sinusoidaux et les artérioles sont en vert ( $Laminin^+$ ), les artères et artérioles sont en rouge ( $Sca-1^+$ )
- B, reconstruction 3D de la région endostéale de la diaphyse fémorale (coupe longitudinale) : les vaisseaux sinusoidaux et les artérioles sont en vert ( $Laminin^+$ ), les surfaces osseuses sont en bleu. ev : vaisseaux endostéaux ; s : sinusöide ; cs : sinus central ; la flèche blanche indique une zone de transition entre une artériole et un vaisseau sinusöidal
- C, reconstruction 3D de la diaphyse fémorale (coupe transversale) : les vaisseaux sinusoidaux sont en bleu ( $VE-cadherin^+/PECAM^+$ ), les artères et artérioles sont en rouge ( $Sca-1^+$ )

Le compartiment vasculaire de la métaphyse est beaucoup moins structuré. Les artères ( $Sca-1^+/Laminin^-$ ) entrant dans la moelle osseuse par le cortex osseux migrent



longitudinalement vers la diaphyse en donnant des petites artérioles qui parcourent la surface osseuse trabéculaire pour se transformer en vaisseaux sinusoides (figure 19 D) (Nombela-Arrieta et al., 2013).

Le volume occupé par les artérioles représente seulement moins de 2% de l'espace total alors que celui occupé par les sinusoides est approximativement de 30% (figure 19 E). Toutefois, la répartition des artérioles et des vaisseaux sinusoidaux n'est pas la même. Les artérioles sont retrouvées majoritairement à proximité de l'endoste alors que les vaisseaux sinusoidaux sont repartis de manière homogène et régulièrement espacés (en moyenne de 45µm) (Kunisaki et al., 2013) (figure 19F).



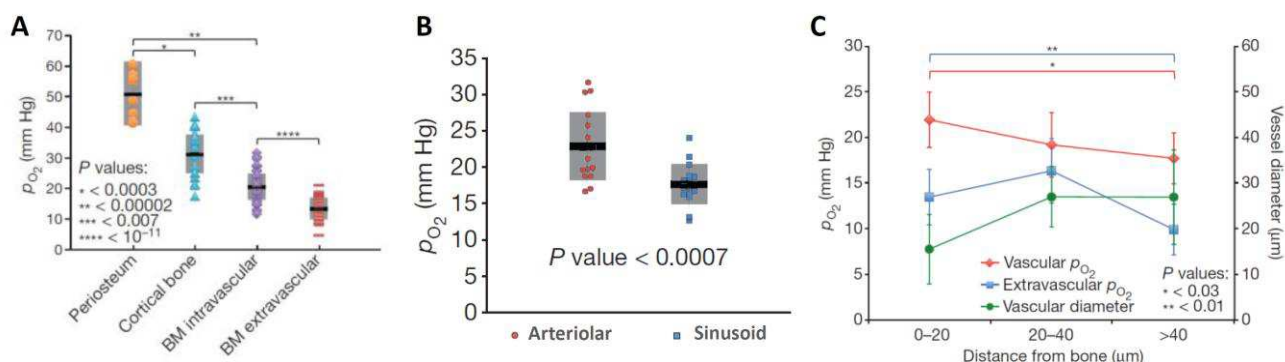
**Figure 19 (bis) : Structure vasculaire de la moelle osseuse fémorale** (Kunisaki et al., 2013; Nombela-Arrieta et al., 2013) :

- **D, reconstruction 3D de la métaphyse fémorale (coupe longitudinale) : les vaisseaux sinusoidaux et les artérioles sont en vert (Laminin<sup>+</sup>), les artères et artérioles sont en rouge (Sca-1<sup>+</sup>)**

- **E, Volume de la moelle osseuse occupé par les artérioles ou les vaisseaux sinusoidaux**
- **F, Distribution des artérioles, des sinusoides et des CSH dans la moelle osseuse fémorale**

#### 4.1.1.3 Répartition de l'oxygène dans l'espace médullaire

En dépit d'une importante vascularisation, la concentration d'oxygène au sein de la moelle osseuse est faible. Une étude réalisée sur la calvaria murine, a montré un épuisement rapide de l'oxygène intravasculaire dans le sens du flux sanguin, entre l'os cortical et la moelle osseuse (4,2% d'O<sub>2</sub> (31,8mmHg) *versus* 2,7% d'O<sub>2</sub> (20,4 mmHg) en moyenne), similaire selon les auteurs à celui observé lors de l'entrée des vaisseaux dans les tumeurs solides très actives métaboliquement. Au sein de la moelle osseuse, les mesures de la concentration d'oxygène intravasculaire ont montré une répartition non homogène, oscillant de 1,5% (11,7 mmHg) à 4,2% d'O<sub>2</sub> (31,7 mmHg). Ces taux d'oxygène chutent significativement dans le milieu extravasculaire, variant de 0,6 à 2,8% d'O<sub>2</sub> (de 4,8 à 21,1mmHg) avec une moyenne de 1,8% d'O<sub>2</sub> (13,3 mmHg) (figure 20 A).



**Figure 20 : Oxygénation de la calvaria murine: A, en fonction de la région étudiée ; B, dans le sang selon le type de vaisseaux ; C, en fonction de la distance entre la prise de mesure et l'os. Adaptée de Spencer et al., 2014.**

La concentration d'oxygène varie selon le type de vaisseaux et la région médullaire étudiés. Les artérioles de petit diamètre (<20µm) majoritairement dans la région endostéale (0 à 20µm) ont une concentration d'oxygène intravasculaire moyenne de 3% (22.7mmHg), supérieure à celle rencontrée, en aval du flux sanguin, dans les sinusoides (>20µm de diamètre) qui est de 2,6% (19,5mmHg) (figure 20 B et C). La concentration d'oxygène extracellulaire mesurée dans la région endostéale (0 à 20µm) est de 1.8% (13.5mmHg) et,

dans les régions plus éloignées de l'os (>40µm), elle est en moyenne de 1,3% (9.9mmHg) (figure 20 C) (Spencer et al., 2014).

Cette étude réalisée avec un nouveau type de sonde, contredit les premiers résultats de mesure du taux d'oxygénation médullaire obtenus sur des os longs murins qui, en utilisant du Pimonidazole, montraient que les zones les plus hypoxiques (<1,3% d'O<sub>2</sub>) se localisaient contre l'endoste (Lévesque et al., 2007). Des études de perfusion réalisées par la même équipe confirmaient en 2010 ces résultats en montrant que les ostéoblastes se situaient dans des zones éloignées des vaisseaux où la diffusion des molécules présentes dans le sang est minime (Hoechst 33342 et par extension, O<sub>2</sub>) (Winkler et al., 2010).

Si l'existence de zones peu perfusées est avérée, l'utilisation de sondes réagissant aux conditions hypoxiques semble inappropriée pour des études sur le taux d'oxygénation extravasculaire médullaire... puisqu'il est probable que ces marqueurs n'accèdent pas à ces zones les plus hypoxiques.

Chez l'homme, les seules études disponibles ont été réalisées grâce à l'élaboration de modèles mathématiques complexes. Ces modèles prédisent un taux d'oxygène variable au sein des différentes régions de la moelle osseuse humaine, décroissant avec le nombre de couches cellulaires autour du vaisseau et pouvant approcher 0% dans des zones distantes des vaisseaux (séparées par plus de 10 couches cellulaires). Pour calculer ce taux d'oxygène, les auteurs tiennent compte de divers paramètres tels que : - les types de cellules hématopoïétiques ou stromales rencontrées dans l'environnement (résultats différents entre les CSH, les progéniteurs et les adipocytes) ; - le flux sanguin ; - le type, le diamètre des vaisseaux (artérioles ou sinusoides) et leur agencement spatial (Chow et al., 2001a, 2001b; Kumar et al., 2004).

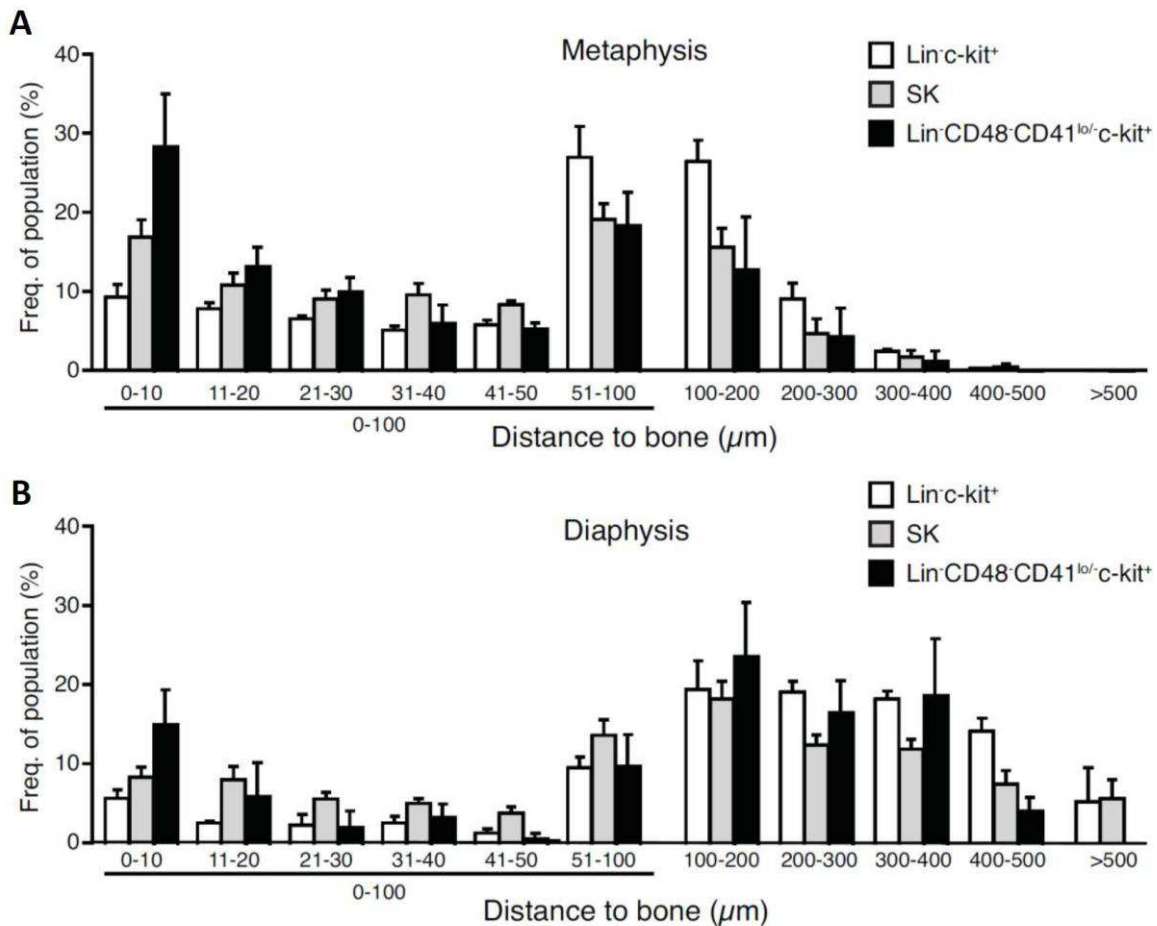
## **4.1.2 Les CSH dans l'espace médullaire**

### **4.1.2.1 Localisation régionale des CSH et des progéniteurs dans l'espace médullaire**

En dépit de la capacité à isoler par FACS les CSH depuis plus d'une vingtaine d'année, leur identification au sein de la moelle osseuse est restée longtemps un challenge du fait de la pauvreté des combinaisons de marqueurs utilisables en microscopie (Morrison and

Scadden, 2014). Grâce aux progrès techniques, de nouvelles études permettant une meilleure compréhension de la localisation des CSH dans la moelle, voient le jour.

Ainsi, une étude parue en 2013, a quantifié par « Laser Scanning Cytometry » les cellules souches et les progéniteurs hématopoïétiques murins (mCSPH ; c-kit<sup>+</sup>) en combinant divers marqueurs de primitivité. Au total, 1900 progéniteurs (c-kit<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>), 1600 progéniteurs multipotents (c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>) et 300 CSH (c-kit<sup>+</sup>CD48<sup>-</sup>CD41<sup>lo/-</sup>Lin<sup>-</sup> (hautement enrichies en cellules SLAM)) ont été comptés dans un fémur de souris avec des fréquences similaires dans la diaphyse et les métaphyses. Toutefois, la distribution de ces trois sous-populations au sein de la diaphyse ou de la métaphyse n'est pas homogène, la fréquence des CSH étant plus importante dans les zones proches de l'endoste, notamment dans la partie métaphysaire (figure 21) (Nombela-Arrieta et al., 2013).



**Figure 21 : Distribution des 3 sous-populations de mCSPH dans la métaphyse (A) et dans la diaphyse (B) d'un fémur murin (les progéniteurs sont en blanc ; les progéniteurs multipotents en gris et les « CSH » en noir) (Nombela-Arrieta et al., 2013).**

Chez l'humain, une analyse *in situ* (immunofluorescence à haute résolution) sur des biopsies de crêtes iliaques de 5 patients, a montré que la fréquence des CSH (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>) était plus importante dans la région corticale (trabéculée et similaire à la métaphyse d'un os long murin ou TBA) que dans la région centrale de l'os (équivalente à la diaphyse murine ou LBA). De plus, cette étude indique que les programmes moléculaires développés dans les CSH « TBA » diffèrent des CSH « LBA » de par l'environnement qui les entoure et ce, de manière réversible. Ainsi, les gènes impliqués dans l'autorenouvellement et la voie Notch sont préférentiellement activés dans les CSH «TBA ». Les gènes permettant la prolifération et la survie seront moins exprimées par comparaison avec les CSH « LBA ». Ces résultats révèlent qu'il existe une hétérogénéité de la localisation et de la capacités fonctionnelles des CSH selon les régions anatomiques de la moelle osseuse (Guezguez et al., 2013).

#### **4.1.2.2 La niche hématopoïétique**

Les CSH sont localisées dans un microenvironnement complexe appelé « niche hématopoïétique » dont la fonction est de les maintenir tout au long de la vie d'un individu (Adams and Scadden, 2006; Morrison and Spradling, 2008; Schofield, 1978). Ce microenvironnement est composé de différentes cellules du stroma médullaire (adipocytes, macrophages, fibroblastes, ostéoblastes, cellules réticulaires (CAR : CXCL12-abundant reticular), cellules endothéliales, cellules mésenchymateuses ...) et de molécules de l'ECM (matrice extracellulaire : fibronectine, laminine, protéoglycanes). Dans ce système interactif, il existe des régulations complexes entre des cellules pouvant être relativement éloignées et qui participent à l'homéostasie environnementale.

Depuis une dizaine d'années, plusieurs études contradictoires suggèrent l'existence de plusieurs types de niches spécialisées contenant des sous populations distinctes de CSH. En 2003, deux études indiquent que la niche hématopoïétique est juxtaposée à l'endoste et est composée d'ostéoblastes. Il a été montré que l'augmentation du nombre d'ostéoblastes entraîne une augmentation du nombre de CSH (Calvi et al., 2003; Zhang et al., 2003). L'existence d'une niche périvasculaire (proche des vaisseaux) a été proposée un peu plus tard, à partir de plusieurs études qui montrent la présence de nombreuses CSH proches des cellules endothéliales sinusoidales (Kunisaki et al., 2013; Nombela-Arrieta et al., 2013) et des cellules stromales périvasculaires incluant : - les CAR (Omatsu et al., 2010;

Sugiyama et al., 2006) ; - les cellules souches mésenchymateuses Nestin<sup>+</sup> (Méndez-Ferrer et al., 2010) ; - les cellules périvasculaires LepR<sup>+</sup> (Leptin receptor<sup>+</sup>)(Ding et al., 2012). Sur la base de ces travaux, le monde scientifique attribuait différents rôles aux deux niches : une implication dans la quiescence pour la niche endostéale ; un rôle dans la prolifération pour la niche périvasculaire (Ema and Suda, 2012; Lévesque et al., 2010; Li and Clevers, 2010).

Actuellement, le faible nombre de CSH en contact avec les ostéoblastes, détectées par imagerie, tempère l'existence de la niche ostéoblastique, du moins telle qu'elle est actuellement définie. Une étude révèle notamment que les CSH proches de l'endoste sont en relation avec les artérioles de cette zone (figure 19 F). Ces CSH sont associées à des cellules souches mésenchymateuses (MSC) Nestin<sup>bright</sup>, au contact des artérioles. Ces MSC sont majoritairement quiescentes (Ki67<sup>-</sup> et 5-FU résistantes) et rares en comparaison des cellules souches mésenchymateuses Nestin<sup>Dim</sup> de forme réticulaire, plus actives et proches des vaisseaux sinusoidaux (Kunisaki et al., 2013). De manière très intéressante, les auteurs ont mis en évidence que seules les cellules souches mésenchymateuses Nestin<sup>bright</sup> étaient accolées à des cellules du système nerveux sympathique (tyrosine hydroxylase<sup>+</sup>) et à des cellules gliales de Schwann, rapportées dans la littérature comme modulateurs des CSH dans la moelle osseuse (Katayama et al., 2006; Yamazaki et al., 2011).

#### **4.1.2.3 Localisation des CSH quiescentes**

La quiescence est une caractéristique importante qui contribue au maintien à long terme des CSH. La localisation spatiale des CSH quiescentes dans la moelle osseuse reste incertaine (Kunisaki et al., 2013).

La population des CSH murines présente deux sous-groupes : une population dormante (15 à 30%) servant de réserve dont la périodicité estimée de division serait très longue (environ 5 mois) et une population de CSH homéostatiques (70 à 85%) se divisant une fois par mois (Trumpp et al., 2010; van der Wath et al., 2009). L'analyse du cycle cellulaire de la population des CSH murines (CD34<sup>-</sup>LSKCD150<sup>+</sup>CD48<sup>-</sup>), montre que 70 à 80% de la population est en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> lors d'analyses instantanées (Ki67<sup>-</sup>) et contient donc un nombre significatif de cellules dormantes (Kunisaki et al., 2013; Suda et al., 2011; Wilson et al., 2008).

## Introduction – Environnement et quiescence

Par des tests de perfusion réalisés à l'aide du colorant Hoechst 33342, plusieurs études ont montré que les CSH murines qui se divisent le moins (CSH dormantes), sont préférentiellement localisées dans les zones les moins perfusées de la moelle osseuse (Parmar et al., 2007; Winkler et al., 2010) et les plus hypoxiques (Lévesque et al., 2007), soit proches des ostéoblastes et de l'endoste, confirmant les résultats déjà obtenus quelques années plus tôt (Calvi et al., 2003; Zhang et al., 2003).

Dernièrement, une étude a confirmé que le nombre de CSH murines quiescentes (Ki67<sup>-</sup>) était plus important à proximité de l'endoste du sternum en montrant qu'elles se situent majoritairement contre les artérioles (parcourant l'endoste murin) et qu'elles sont associées aux MSC Nestin<sup>bright</sup> quiescentes (Kunisaki et al., 2013).

Prenant en considération les publications de ces dernières années, la figure 22 représente un modèle simplifié de localisation des CSH et de leur état.

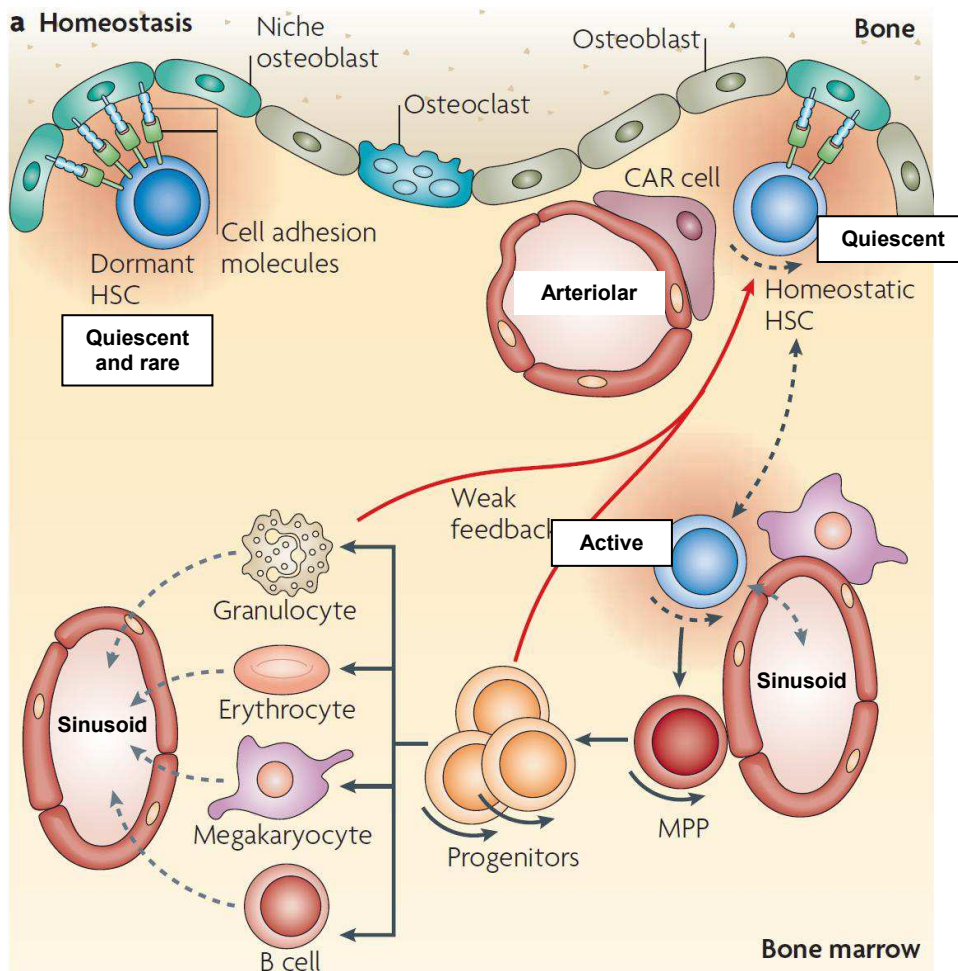


Figure 22 : Localisation des CSH dans la moelle osseuse adaptée de (Trumpp et al., 2010).



## 4.2 Inducteurs extrinsèques de la quiescence des CSH

La localisation des CSH quiescentes n'étant pas aléatoire, il est admis que l'environnement joue un rôle déterminant dans l'induction et le maintien en quiescence des CSH.

### 4.2.1 Les couples ligands/récepteurs impliqués dans la quiescence

Les cellules de l'environnement secrètent des facteurs qui en activant des récepteurs exprimés majoritairement, voire exclusivement, à la surface des CSH vont réguler l'entrée ou le maintien des cellules en quiescence. Les plus pertinents sont présentés dans le tableau 8, établi à partir de différents modèles de souris.

Ligand	Receptor	Mouse model	Effect on quiescence
Ang-1	Tie2	Immunophenotypic identification and functional characterization of Tie2-positive HSCs	Positive
THPO	Mpl	Immunophenotypic identification of Mpl-positive HSCs. Blocking signaling with anti-Mpl antibodies	Positive
Wnt	Frizzled	Transgenic mice expressing the Wnt inhibitor Dkk1 driven by an osteoblast-specific promoter	Positive
		Cross of mice with the insertion of the Myc-tagged stable form of human $\beta$ -catenin into the R26 locus with Mx1-Cre mice	Negative
TGF $\beta$	TGFBR	cKO TGFBR1 ( <i>Mx1-Cre</i> )	No effect at steady-state
		TGF $\beta$ levels during myelosuppression and blockade of TGF $\beta$ during recovery	Reset quiescence after cytoablation
IFN $\gamma$	IFNGR	<i>IFN<math>\gamma</math> -/-</i> , <i>Mycobacterium avium</i> infection	Negative
SDF1(CXCL12)	CXCR4	<i>Cxcr4 -/-</i>	Positive
OPN		<i>Opn -/-</i>	Positive
Hh	Patched	<i>Gli1 -/-</i> (downstream transcription factor) <i>Ptc +/-</i>	Negative
SCF	c-kit	SCF isoform -/- as a recipient	Positive

**Tableau 8 : Liste non exhaustive des couples ligands/récepteurs impliqués dans la quiescence des CSH murines** (Yamada et al., 2013).



## **4.2.2 Rôle de l'oxygène dans la quiescence**

En partant du principe que les CSH sont localisées dans des niches hypoxiques, plusieurs études se sont intéressées au rôle que pouvait jouer l'oxygène dans le maintien *in vitro* des CSH et des progéniteurs ainsi que dans la quiescence.

### **4.2.2.1 Rôle de l'oxygène dans le maintien des CSH (CD34<sup>+</sup>)**

L'implication de l'oxygène dans le maintien des CSH est aujourd'hui incontestable. Les premiers travaux explorant directement le rôle et les mécanismes d'action des faibles concentrations d'O<sub>2</sub> sur les CSH remontent à plus de vingt ans (Cipolleschi et al., 1993). Depuis les années 2000, plusieurs études ont montré que la culture à 3% d'oxygène de cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques (CD34<sup>+</sup>) permet : - un meilleur maintien des populations SRC (SCID Repopulating cells) ainsi que de la population pré-CFC (Colonie Forming Cells) ; - une amplification des progéniteurs CFC comparable à la culture à 21% d'oxygène (Ivanovic et al., 2004). Tout en gardant un meilleur maintien des SRC et des pré-CFC, la culture de ces cellules entre 1% et 1,5% d'oxygène diminue l'expansion des CFC (Danet et al., 2003; Ivanović et al., 2000).

### **4.2.2.2 Rôle de l'oxygène dans la quiescence cellulaire**

Peu d'études ont été réalisées *in vitro* sur l'impact de l'oxygène sur la quiescence des cellules hématopoïétiques. En 2006, notre groupe a montré qu'une culture de 3 jours à 0,1% d'oxygène de CSPH humains (hCD34<sup>+</sup>), entraîne : - un arrêt de la prolifération sans augmentation de la mortalité cellulaire ; - un maintien de la population SRC. Les auteurs ont montré que la culture à 0,1% d'oxygène induit une augmentation significative du nombre de cellules quiescentes (KI67<sup>-</sup>) par rapport à une culture à 20% ou 3% d'oxygène (Hermitte et al., 2006). Dernièrement, nous avons confirmé ces résultats sur une lignée de progéniteurs murins (FDCP-mix). Nous montrons que la culture à 0,1% d'oxygène entraîne : - un arrêt de la prolifération cellulaire sans augmentation de la mortalité ; - une augmentation de la proportion des cellules quiescentes (Ki67<sup>-</sup>) au détriment des autres phases du cycle cellulaire ; - une augmentation de l'expression de p27 couplée à une augmentation de la forme hypophosphorylée de pRB (Guitart et al., 2011).

#### 4.2.2.3 Rôle de HIF-1 dans la quiescence des CSH

La réponse des CSH à l'hypoxie est essentiellement médiée par les facteurs de transcription hétérodimériques « Hypoxia-inducible factors » (HIF). Au nombre de 3 (HIF-1, HIF-2 et HIF-3), HIF-1 est le plus étudié et est composé : - d'une sous-unité  $\beta$  stable (HIF-1 $\beta$  appelée aussi ARNT) ; - d'une sous-unité  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) constitutivement transcrite, traduite, mais dégradée par le protéasome lorsque la pression partielle cellulaire d'O<sub>2</sub> dépasse 6 mm de Hg (soit environ 3%) (pour les mécanismes, voir Semenza, 2007 et Kaelin Jr. and Ratcliffe, 2008). Le rôle d'HIF-2 dans l'hématopoïèse étant sujet à controverse (Guitart et al., 2013; Rouault-Pierre et al., 2013) et HIF-3 n'étant que peu étudié (Tanaka et al., 2009), il ne seront pas discutés.

A faible concentration d'O<sub>2</sub>, la sous-unité  $\alpha$  est stabilisée et transloquée dans le noyau. En 1996, une étude réalisée dans le modèle cellulaire HeLa, indique une stabilisation maximale de HIF-1 $\alpha$  pour des cellules cultivées à 0,5% d'O<sub>2</sub>. Cette stabilisation maximale, décroît très rapidement jusqu'à 3% d'O<sub>2</sub> (elle n'est plus que de 50% à 1,5-2% d'oxygène) ; au dessus de 5% d'O<sub>2</sub>, la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  est faible et n'évolue que très peu (Jiang et al., 1996). La dimérisation nucléaire avec la sous-unité  $\beta$  va permettre au facteur de transcription HIF de reconnaître à des séquences d'ADN très particulières appelées HRE (Hypoxia Responsive Element). Cette association ainsi que la liaison avec des co-activateurs transcriptionnels (CBP/p300) vont promouvoir la transcription de gènes impliqués dans un large éventail de fonctions physiologiques telles que le métabolisme du glucose, la migration, la survie et la prolifération cellulaire (figure 23)(Gezer et al., 2014; Schödel et al., 2011).

Takubo *et al.* ont montré en 2010 que HIF-1 $\alpha$  murin est préférentiellement exprimé dans les CSH long terme les plus hypoxiques, où son transcrit est abondant (le taux de transcrit décroît au cours de la différenciation). Dans le modèle murin Ko *HIF-1 $\alpha$ <sup>ΔΔ</sup>* seule la fraction des CSH long terme quiescentes est diminuée (Ki67<sup>neg</sup> ou PyroninY low), suggérant un rôle restreint aux cellules les plus primitives (Takubo et al., 2010). Dernièrement, Forristal *et al.* ont confirmé ces résultats par une approche pharmacologique *in vivo*, permettant d'augmenter la quantité de HIF-1 $\alpha$  des leucocytes de la moelle osseuse murine (en inhibant les protéines impliquées dans sa dégradation [inhibition des PHD par le DMOG ou le FG-4497]). La stabilisation de HIF-1 $\alpha$  augmente significativement la proportion des CSH et des

progéniteurs quiescents. De plus, ce traitement permet une meilleure protection des CSH long terme contre les irradiations sévères (figure 23)(Forristal et al., 2013).

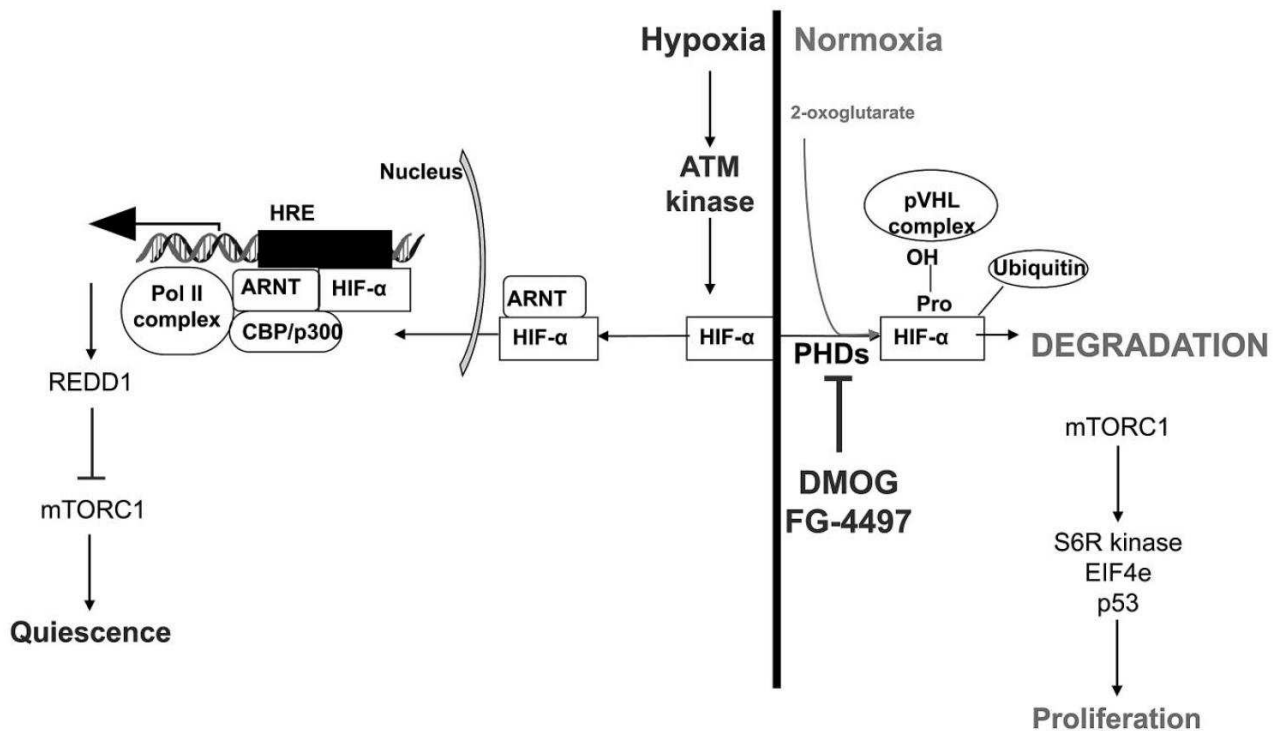


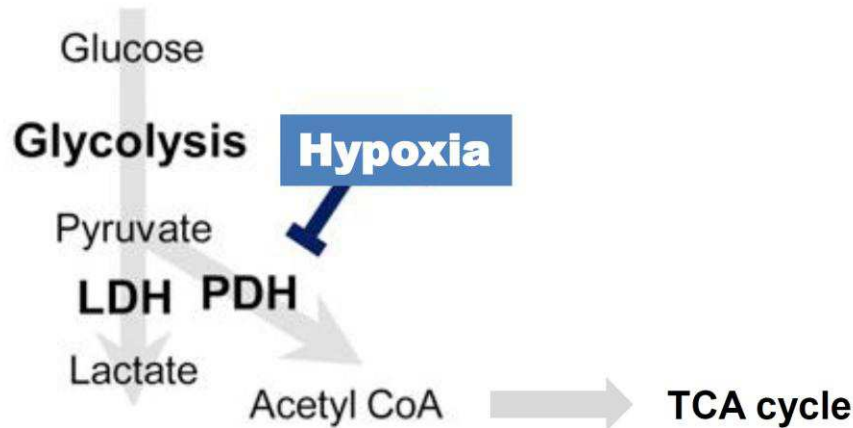
Figure 23 : Régulation de la protéine HIF-1α dans des conditions « normoxiques » et « hypoxiques » et effets envisagés sur la quiescence (Forristal et al., 2013).

#### 4.2.2.4 Métabolisme énergétique des CSH quiescentes en hypoxie

Simsek *et al.* ont montré que la majorité des CSH long terme présentait un faible niveau d'ATP ainsi qu'un potentiel mitochondrial faible suggérant une utilisation préférentielle de la glycolyse cytoplasmique pour le métabolisme énergétique, au détriment de l'oxydation phosphorylante mitochondriale qui nécessite de l'oxygène et des métabolites issus du cycle de Krebs (appelé aussi cycle des acides tricarboxyliques ou TCA). Le bilan énergétique de la glycolyse est faible (production de 2 ATP et 2 NADH). Les auteurs ont mis en évidence que ce phénotype métabolique était associé à une sur-activation transcriptionnelle de HIF-1 (Simsek *et al.*, 2010).

La voie glycolytique comporte des réactions enzymatiques permettant de convertir le glucose en pyruvate. Le pyruvate peut être transformé par : - la pyruvate deshydrogénase

(PDH) en acétyl coenzymeA qui est un substrat du cycle mitochondrial TCA ; - la lactate deshydrogenase (LDH) en lactate, excrété dans l'espace extracellulaire (figure 24).



**Figure 24 : Représentation schématique de la glycolyse et de l'effet de l'hypoxie sur le métabolisme énergétique.** adapté de Takubo et al., 2013

Récemment, Takubo *et al.* ont montré que seules les cellules les plus primitives avaient la capacité de survivre sans la génération d'énergie mitochondriale, montrant une spécificité métabolique des CSH. Les auteurs ont mis en évidence que l'expression d'inhibiteurs de la PDH (et donc du cycle TCA) est corrélée avec celle de HIF-1 $\alpha$  et que ces inhibiteurs jouent un rôle important dans la mise en place de la quiescence cellulaire pour survivre à des conditions extrêmes, par altération de l'activité métabolique (Takubo et al., 2013). De manière intéressante, il a été mis en évidence dans des fibroblastes embryonnaires murins *HIF-1 $\alpha$ <sup>-/-</sup>*, qui ne peuvent donc pas inhiber la voie glycolytique, que la concentration de 1% d'oxygène n'était pas une limite à l'oxydation phosphorylante (Suda et al., 2011) posant la question du rôle des plus faibles concentrations d'oxygène dans ce changement métabolique.

## 5 Quiescence et résistance dans les leucémies aigües

### 5.1 Le modèle des Leucémies Aigües Myéloblastiques (LAM)

Les premiers travaux proposant que des cellules de leucémie aigüe pouvaient être quiescentes remontent à la fin des années 90, grâce à des expériences de traitement au 5-FU *in vitro* de cellules de patients atteints de LAM, suivi d'une transplantation avec greffe leucémique dans des modèles NOD-SCID (Terpstra et al., 1996). Ces résultats seront confirmés en 2003 par Guan *et al.* qui montrent que des cellules leucémiques quiescentes (Pyronine<sup>low</sup>), dont des Cellules Initiatrices de Leucémie (CIL), sont présentes dans la majorité des LAM et qu'elles sont capables lors de culture *in vitro*, de ré-entrer dans le cycle cellulaire actif (Guan et al., 2003). Plus récemment, Ishikawa *et al.* ont rapporté que des CIL sont capables après transplantation, de greffer et de se nicher dans des zones de la moelle osseuse riches en ostéoblastes où elle sont protégées des chimiothérapies. Les auteurs suggèrent que la quiescence doit être à l'origine de cette résistance (Ishikawa et al., 2007), ce qu'ils mettront en évidence trois ans plus tard. Les auteurs montreront dans ce dernier article qu'une activation du cycle cellulaire des cellules quiescentes par injection d'un facteur de croissance (G-CSF), en combinaison avec la chimiothérapie, permet d'augmenter significativement la survie de souris NSG greffées avec des cellules leucémiques, en éliminant les CIL humaines (Saito et al., 2010a).

Les mécanismes impliqués dans la quiescence des CIL restent méconnus. L'acquisition par les CIL de ce caractère fonctionnel propre aux CSH a incité certaines équipes à rechercher des voies de signalisation communes impliquées dans la quiescence entre CSH et CIL. Ainsi, il a été montré dans certains types de LAM une surexpression de la protéine Angiopoïétine 1 induisant, en se liant sur son récepteur tyrosine kinase Tie2, une surexpression de la CKI p18, inhibant la progression du cycle cellulaire (Ichihara et al., 2011). Dernièrement, un groupe de recherche travaillant avec le modèle murin MLL-AF9, a rapporté que p27, induit par le Flt3-ligand et le SCF, est responsable : - du maintien en quiescence de la fraction de cellules leucémiques primitives CD117<sup>+</sup>CD11b<sup>low</sup> contenant une forte proportion de CIL ; - de la résistance aux chimiothérapies (Ara-C et Daunorubicin) (Zhang et al., 2013).

Comme pour les CSH humaines normales, le niveau de transcrit de HIF-1 $\alpha$  est plus élevé dans les CIL les plus primitives (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>) des LAM. Le traitement par un inhibiteur de HIF-1 $\alpha$  (echinomycin) de souris greffées (LAM<sup>+</sup>), diminue de cinq fois la fréquence des CIL CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> conduisant à une perte de la capacité de greffe de ces cellules lors de transplantations en série (Wang et al., 2011).

La localisation au sein de la niche hématopoïétique apparaît être importante pour la survie des CIL de LAM qui pourraient détourner à leur profit la signalisation d'un grand nombre de voies (figure 25). L'interaction entre le récepteur CXCR4, exprimé en condition normale par les CSH, et son ligand chimio-attractant CXCL12 (ou SDF-1) constitutivement secrété par les cellules stromales de la moelle osseuse, semble être aussi impliquée dans la survie des cellules leucémiques. Un niveau d'expression élevé du CXCR4 à la surface des cellules de LAM a été rapporté comme étant un indicateur de leucémie de mauvais pronostic (Lane et al., 2009).

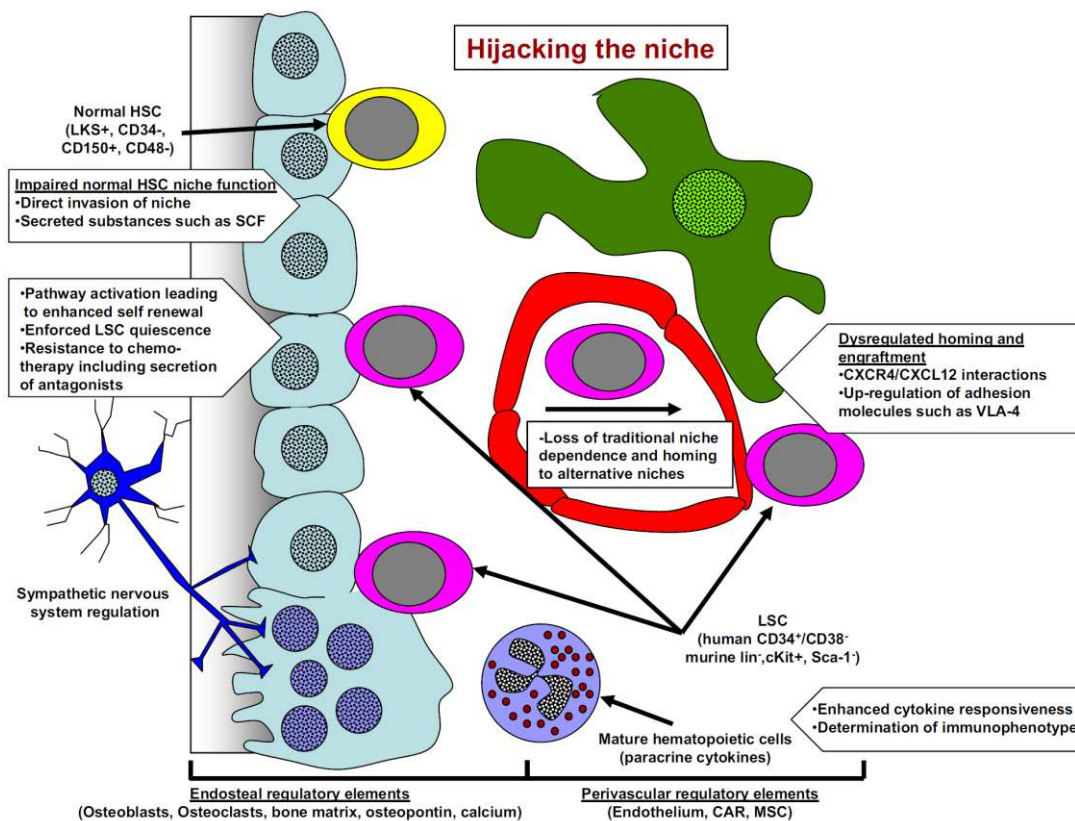
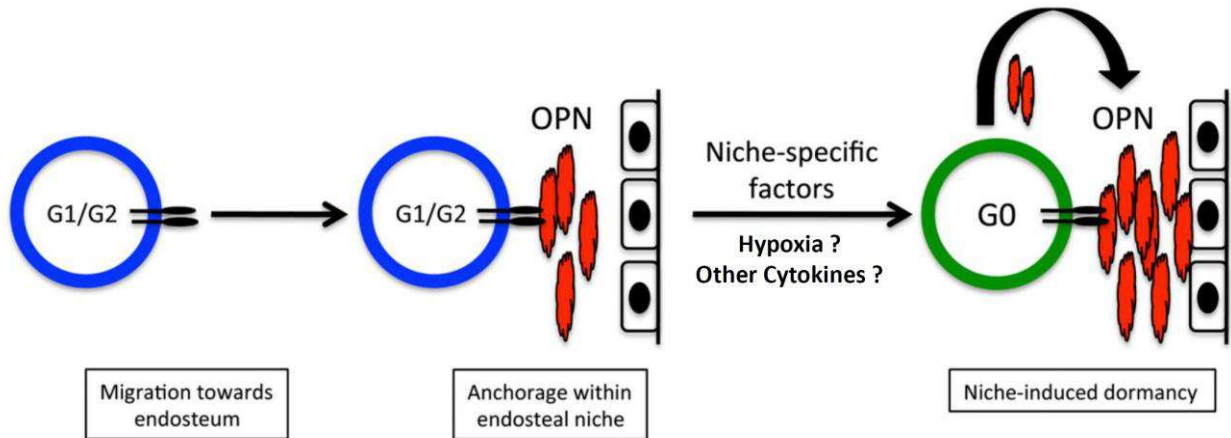


Figure 25 : Mécanismes putatifs d'interaction entre la niche hématopoïétique et les CIL de LAM (Lane et al., 2009)

## **5.2 Rôle de l'environnement dans la quiescence et la résistance des LAL**

La lymphopoïèse B précoce normale est contrôlée par le microenvironnement de la moelle osseuse, notamment par le contact avec les ostéoblastes, par des molécules d'adhésion (VCAM-1) et par des cytokines (CXCL12, IL-7, SCF, FLT3 Ligand ...) (Nagasawa, 2006; Zhu et al., 2007). La transplantation de lignées humaines de LAL comme la NALM6 (CXCR4<sup>+</sup>) dans des souris SCID, a permis de mettre en évidence une migration préférentielle des cellules leucémiques dans les minutes qui suivent l'injection. Les blastes sont localisés dans les niches normales périvasculaires de la moelle osseuse, qui contiennent en condition normale des CSPH quiescents et des cellules stromales sur-exprimant le CXCL12 en condition hypoxique (Sipkins et al., 2005). L'injection d'un antagoniste du CXCR4 (l'AMD3100) entraîne : - une diminution importante du « homing » des cellules leucémiques ; - une mobilisation des cellules leucémiques dans le sang accompagnée d'une diminution de la proportion de cellules leucémiques quiescentes ; - une augmentation de l'efficacité de drogues spécifiques du cycle cellulaire telles que la vincristine (Sison et al., 2013; Welschinger et al., 2013).

Dernièrement, il a été montré que l'ostéopontine (OPN), exprimée par les ostéoblastes endostéaux et impliquée en condition normale dans la migration et l'autorenouvellement des CSH, peut permettre aux cellules de LAL de s'ancrer dans des niches endostéales. Les auteurs ont mis en évidence en utilisant la lignée NALM6 et des cellules primaires de LAL, que des cellules dormantes étaient majoritairement présentes dans ces niches et que la neutralisation de l'OPN *in vivo* entraînait : - une augmentation de la population proliférante humaine (Ki67<sup>+</sup>) ; - une meilleure sensibilité des cellules leucémiques à l'Ara-C. Durant la progression tumorale, il est montré que la niche est remodelée et que les cellules de LAL sécrètent à leur tour de l'OPN amenant à une boucle de rétrocontrôle positif renforçant le phénotype dormant de la population leucémique. Toutefois, les auteurs proposent que l'OPN joue plutôt un rôle indirect dans la dormance via d'autres facteurs du microenvironnement tels que d'autres cytokines ou l'hypoxie (figure 26) (Boyerinas et al., 2013).



**Figure 26 : Modèle de dormance endostéale des LAL induite par l'ostéopontine** adapté de Boyerinas et al., 2013

Peu de travaux sur le rôle de l'hypoxie dans la résistance des LAL ont été effectués. En 2011, Benito *et al.* ont mis en évidence dans quelques modèles leucémiques humains et murins *in vivo*, une expansion des zones hypoxiques (révélée au pimonidazole et par l'étude de HIF-1 $\alpha$ ) de la moelle osseuse dans les étapes avancées de la maladie, due probablement à l'expansion de la masse tumorale qui entraîne une augmentation de la consommation d'oxygène par les blastes et une diminution mécanique de la perfusion. Les auteurs ont montré que l'injection de PR-104, une drogue spécifiquement activée à des concentrations d'O<sub>2</sub> <1%, à des souris NSG préalablement transplantées avec des cellules NALM6 ou avec des cellules primaires, permettaient de diminuer significativement les zones tumorales hypoxiques ainsi que le développement de la leucémie. Aux vus de ces résultats, une localisation des CIL dans les régions les plus hypoxiques de la moelle osseuse est suggérée (Benito et al., 2011).

Ayant constaté que la culture à 1% d'oxygène induisait une inhibition de la croissance cellulaire de lignées de LAL (dont la NALM6) sans surmortalité ainsi qu'une chimiorésistance à la vincristine et au methotrexate, la même équipe s'est intéressée au rôle de HIF-1 $\alpha$  dans cette résistance. Ils ont montré sur les mêmes modèles, que la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  en condition normoxique engendrait des résultats de résistance similaires alors que son inhibition en condition hypoxique ré-induisait un effet cytotoxique de la chimiothérapie. Ces résultats indiquent que HIF-1 $\alpha$  ainsi que ses cibles sont des médiateurs clefs de l'effet protecteur de l'hypoxie. Les auteurs ont aussi mis en évidence un rôle synergique de la co-culture avec des cellules stromales et des faibles



concentrations d'oxygène sur le taux de transcrit HIF-1 $\alpha$  par activation de la signalisation mTOR. Une inhibition de mTOR dans ces conditions de co-culture entraîne une diminution de HIF-1 $\alpha$  ainsi qu'une diminution de la consommation de glucose des cellules leucémiques (Frolova et al., 2012). Le rôle de mTOR dans la quiescence et la résistance aux chimiothérapies avait déjà été évoqué dans les LAL à translocation BCR-ABL ou les auteurs avait montré *ex vivo* que les cellules résistantes aux traitements à l'imatinib sont majoritairement en quiescence et représentent la fraction la plus primitive de la LAL (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>). Les auteurs ont montré que le co-traitement de ces cellules ou de souris xénogreffées, avec un inhibiteur de mTOR et avec l'imatinib, diminuait fortement la proportion des cellules quiescentes et résistantes (Kuwatsuka et al., 2011).

# **Objectifs de travail et approche expérimentale**

## *Objectifs de travail et approche expérimentale*

## Présentation des objectifs de travail

Malgré les améliorations du traitement des LAL, le taux de rechute reste important notamment chez l'adulte (Cornell and Palmer, 2012). Ces rechutes, dont la fréquence dépend en partie de l'anomalie cytogénétique initiale, sont dues à des cellules résistantes (dormantes ?) aux traitements, capables de ré-initier la LAL (les CIL) à plus ou moins long terme sous l'influence de facteurs probablement extrinsèques. Ces CIL ont conservé ou acquis des caractéristiques de cellules souches hématopoïétiques normales : - la capacité de migrer et de détourner à leur profit la niche hématopoïétique (supposée « hypoxique ») où siègent les CSH ; - la capacité à entrer et à se maintenir en quiescence. Plusieurs études ont montré un rôle majeur de certains facteurs de l'environnement dans la quiescence/dormance des CIL (Boyerinas et al., 2013; Lane et al., 2009; Sipkins et al., 2005; Zhang et al., 2013).

Notre groupe s'intéresse depuis plusieurs années au rôle d'un facteur environnemental, l'oxygène, dans la biologie fonctionnelle des cellules souches hématopoïétiques normales en particulier pour leur maintien en quiescence (Guitart et al., 2011; Hermitte et al., 2006). Des travaux antérieurs ont permis de mettre en évidence que de très faibles concentrations d'oxygène (0,1%) permettaient d'induire *in vitro* l'entrée en quiescence des CSPH (confer paragraphe 4.2.2).

Partant du postulat que la CIL est fonctionnellement proche de la CSH normale, nous nous sommes intéressés au rôle que pouvait jouer l'oxygène dans la quiescence des cellules leucémiques de LAL. Les objectifs du travail présentés dans ce manuscrit, étaient simples et de deux ordres :

- I. Montrer *in vitro* que des cellules initiatrices de LAL (les CIL) cultivées à très faibles concentrations d'oxygène (0,1%) peuvent, comme les CSPH normaux :
  - ✓ Survivre,
  - ✓ Etre induites en quiescence (phase G<sub>0</sub> du cycle cellulaire),

## *Objectifs de travail et approche expérimentale*

- La phase de quiescence devant être caractérisée par une étude de l'expression de protéines connues pour être sur ou sous-réglées dans cette phase.
  - Cette quiescence peut être apparentée à la dormance cellulaire c'est-à-dire à un arrêt prolongé du cycle cellulaire des LAL permettant aux CIL de résister à des traitements administrés durant plusieurs jours.
- II. Montrer que comme les CSPH normaux, des cellules initiatrices de LAL (les CIL) xénogreffées peuvent :
- ✓ migrer dans la niche hématopoïétique (région peu perfusée hypoxique), ce qui induit leur dormance. Le contexte environnemental permettant d'accentuer leurs « attitudes souches » en ré-activant certaines voies impliquées dans la survie des CSH.
  - ✓ résister in vivo à des chimiothérapies. Les CIL résiduelles après traitement sont majoritairement quiescentes et préférentiellement localisées dans des sites « sanctuaires » de régions peu perfusées hypoxiques comme la niche hématopoïétique ou peut-être la moelle osseuse adipeuse.

## Approche expérimentale choisie

Nous nous sommes exclusivement intéressés aux LAL de types B qui sont les plus fréquentes chez l'enfant.

Nous avons envisagé d'utiliser comme modèle d'étude des cellules primaires de LAL-B. Dans un premier temps, la difficulté d'approvisionnement en échantillons de cellules primaires de patient ainsi que l'inexpérience de l'équipe dans le domaine des LAL, nous ont amené à développer toutes les techniques et les méthodes expérimentales avec une lignée de LAL-B, la lignée NALM6. Les résultats de ces travaux, décrits ci-dessous, ont été obtenus avec cette lignée et ils devront être confirmés avec des cellules de patients.

Grâce au « Centre de Ressources biologiques » du CHU de Bordeaux, nous avons obtenu vingt échantillons de cellules de patients non traités atteints de LAL-B. Du fait de l'hétérogénéité des échantillons (anomalie cytogénétique, tissu prélevé (sang ou moelle), âge (adulte ou pédiatrique) et sexe des donneurs), nous avons choisi d'étudier l'effet de l'hypoxie sur la survie, la quiescence et la chimiorésistance des CIL de LAL sans prendre en compte leurs spécificités de type.

### **Etudes *in vitro* :**

#### Survie cellulaire :

Elle a été étudiée par des comptages au bleu trypan. Le taux de mortalité après culture a été validé par un marquage des cellules à l'annexin V. La résistance aux chimiothérapies des cellules en culture a été mesurée par CMF avec un intercalant de l'ADN (iodure de propidium) qui indique le taux de mortalité de la culture après incubation.

#### Quiescence cellulaire :

Elle est étudiée en CMF par l'étude de l'expression : - du Ki67 couplé à un intercalant fluorescent passif de l'ADN du type, l'iodure de propidium ; - des co-facteurs de transcription « pocket protein » pRB, p107 et p130 ; - des CKI : p21, p27 et p57. Afin d'étudier la durée de la quiescence observée, nous avons : - utilisé un analogue des acides nucléiques, l'EdU, incorporé durant la phase de réplication de l'ADN (phase S) du cycle cellulaire ; - marqué à T0 la membrane plasmique des cellules avec un colorant lipophile fluorescent (le DiD), dilué par deux après chaque mitose.

#### Mise en évidence des CIL :

La CIL étant définie par sa capacité à reproduire la leucémie d'origine *in vivo*, leur présence en fin de culture en hypoxie avec ou sans drogue a été révélée par des transplantations à des souris immunodéficientes NSG, suivies d'une analyse phénotypique de la leucémie développée. Des études *in vitro* de clonogénicité et de capacité CRC (Culture Repopulating Cells) ont complété ces résultats.

### **Etudes *in vivo* :**

## *Objectifs de travail et approche expérimentale*

### Transplantation des cellules primaires :

Afin d'éliminer des échecs de prise de greffe des cellules de patients par défaut d'adressage médullaire, les cellules ont été transplantées en intra-fémoral. La prise de greffe, variable selon les échantillons, sera suivie tous les 15 jours par prélèvement en intra-fémoral (toujours dans le même os). Au sacrifice, les fémurs contralatéraux ainsi que les tibias seront utilisés en priorité pour les analyses.

### Chimiothérapie des souris :

Nous avons choisi dans un premier temps, de ne traiter les animaux xéno greffés qu'avec du 5-FU, bien maîtrisé par notre groupe et largement employé pour sélectionner spécifiquement les cellules quiescentes *in vivo*.

### Mise en évidence des CIL et caractérisation du cycle cellulaire:

Comme précédemment, les CIL résiduelles seront mises en évidence par des transplantations secondaires, voire tertiaires, suivies d'une analyse de leur profil phénotypique. L'état de leur cycle cellulaire sera déterminé par l'étude de l'expression du Ki67.

### Localisation des CIL :

Seules les études histologiques permettent de localiser des blastes *in vivo*. Nous avons choisi une approche immunohistochimique grâce à la collaboration d'une équipe Nantaise. La moelle osseuse fémorale ainsi que celle des vertèbres lombaires et caudales seront analysées. La comparaison des moelles caudales (très adipeuses) et lombaires (hématopoïétiques) permettra d'étudier l'implication du tissu adipeux médullaire dans la dormance des CIL. Les régions hypoxiques seront révélées par un marquage des cellules au pimonidazole et par l'étude de l'expression de HIF-1 $\alpha$ .

# Résultats





## **6 Cellules NALM6 : L'hypoxie induit quiescence et chimiorésistance *in vitro*.**

Les expériences décrites dans cette partie font l'objet d'un article en préparation pour lequel des expériences restent à réaliser.

## 6.1 Matériel et méthodes

### 6.1.1 Lignée NALM6

La lignée NALM6 (cellules pré-B ; DSMZ ; #ACC-128) a été établie en 1976 à partir du sang périphérique d'un homme de 19 ans atteint d'une LAL-B, en rechute (Hurwitz et al., 1979). Elle présente un caryotype proche du diploïde et l'anomalie cytogénétique rencontrée est une translocation t(5 ; 12)(q33.2 ; p13.2). La lignée est composée de petites cellules non adhérentes rondes (10µm environ de diamètre) qui se divisent toutes les 24 heures.

### 6.1.2 Protocole de culture primaire (LC1 ; 7 jours)

Cette lignée est cultivée à 37°C dans une atmosphère saturée en eau, en milieu de culture dit « d'entretien » : RPMI 1640 GlutaMAX, 25mM HEPES (Invitrogen ; #72400-021) supplémenté avec du Sérum de Veau Fœtal (SVF ; 10% (v/v) ; PAA ; #A15-101), de la Penicilline (100 unité/mL) et de la Streptomycine (100 µg/mL) (Invitrogen ; #15140-122).

A jour 0 (J0), les cellules sont implantées à 250 000 cellules/mL en condition « normoxique » (20% d'O<sub>2</sub> ; 5% de CO<sub>2</sub>) ou « hypoxique » (0,1% d'O<sub>2</sub> ; 5% de CO<sub>2</sub>) (Biospherix ; XVivo) et cultivées durant 7 jours (Culture Liquide primaire ou LC1) . Les trois premiers jours de LC1 sont considérés comme une étape d'acclimatation des cellules à l'hypoxie. A J3 de LC1, les cellules sont comptées, centrifugées et re-implantées à 250 000 cellules/mL dans un milieu pré-incubé 1 heure aux deux concentrations d'O<sub>2</sub>. Toutes les mesures expérimentales ont lieu durant cette deuxième partie de la LC1 (entre le J3 et J7).

### 6.1.3 Analyse de la prolifération et de la mortalité cellulaire

Elles sont suivies à J3, J5 et J7 de LC1 par comptage en cellule de Malassez des cellules préalablement diluées dans une solution de PBS - Bleu Trypan (0,1% (m/v) ; Invitrogen ; #15250-061).

La division cellulaire est aussi suivie par CMF à J3 et J7 après marquage des membranes plasmiques à J0 par un fluorochrome lipophile, le Vybrant® DiD (Life Technologies ; #V22887), selon le protocole préconisé par le fabricant (incubation de 20 minutes). L'intensité de fluorescence de chaque cellule est divisée par deux après chaque mitose.

L'apoptose est évaluée en CMF (BD ; LSRFortessa) après un double marquage à l'annexin V-Iodure de propidium (BD Biosciences ; #556547) suivant le protocole du fabricant.

### 6.1.4 Analyse du cycle cellulaire en CMF

#### 6.1.4.1 Marquage Ki67, pRB, pRB phosphorylé

250 000 cellules NALM6 incubées en hypoxie ou en normoxie sont lavées une fois au PBS et centrifugées (300g ; 5 minutes ; 20°C). Les cellules sont remises en suspension et incubées à l'obscurité (45 min ; 4°C) dans 100µL d'une solution extemporanée de fixation et perméabilisation (H<sub>2</sub>O ; 0,05% (m/v) Saponine ; 0,4% (m/v) PFA ; 10 mM HEPES). Après un double lavage (300g ; 5 min ; 20°C) dans du « tampon de lavage » (PBS complété avec du SVF (5% ; v/v) et de l'EDTA (2 mM)), les cellules sont resuspendues et incubées (30 min ; 4°C) avec 5µL d'anticorps (tableau 9).

L'anticorps primaire anti-pRB (protéine du RétinoBlastome) n'étant pas couplé, une étape supplémentaire de lavage dans du « tampon de lavage » suivie d'une d'incubation (30 min ; 4°C) avec un anticorps secondaire anti-IgG murin PE (Beckman Coulter ; IM0855) dilué au 1/200 dans du PBS sera réalisée.

Après lavage en PBS, les cellules sont reprises dans 250µL d'une solution de PBS additionnée de TO-PRO®-3 Iodide (1µM ; Life Technologies ; #T3605) et analysées en CMF (BD ; LSRFortessa).

Anticorps utilisés	Fluorochromes couplés	Fournisseurs	Réf.	Clones
Anti-Ki67	PE	BD Pharmingen	556026	B56
Anti-Phospho S780 RB	Alexa Fluor 647	BD Phosflow	558555	J146-35
Anti-Phospho S807/811 RB	PE	BD Phosflow	558549	J112-906
Anti-pRB total	Non couplé	BD Pharmingen	554136	G3-245

Tableau 9 : Anticorps utilisés pour caractériser le cycle cellulaire de la NALM6.

#### 6.1.4.2 Marquage Click-iT® EdU

L'EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) est un analogue de la Thymidine qui s'incorpore à l'ADN durant la phase de réplication des cellules (phase S). Sa détection par le Click-iT® EdU Flow Cytometry Assay kit (Life Technologies ; C10425) est basée sur une réaction « click », qui permet à un azide de former une liaison covalente avec le groupement alkyne de l'EdU. Le protocole de marquage du fabricant a été suivi sans modification.

A J3 de la LC1, l'EdU (1µM final) est ajouté à la culture. A J5 et J7 de LC1, 500 000 cellules NALM6 incubées en hypoxie ou en normoxie sont centrifugées et analysées (300g ; 5 minutes ; 20°C).

#### **Analyse de la résistance de la NALM6 aux traitements durant la LC1**

Suite au repiquage des cellules à 250 000 cellules/mL à J3 de la LC1, des drogues sont ajoutées à la culture. Leur nom et la concentration utilisée sont énumérés dans le tableau 10, leur mécanisme d'action dans le paragraphe 1.2.2.

Drogues	Famille	Concentrations	Fournisseurs
5-FluoroUracile (5-FU)	Antimétabolite	25µg/mL	Dakota – 50mg/mL
Cytarabine (Ara-C)	Antimétabolite	0,05µg/mL	Sandoz – 50mg/mL
Daunorubicine (DNR)	Anthracycline	0,1µg/mL	Sigma ; #30450
Méthylprednisolone (MPred)	Glucocorticoïde	15µg/mL	Pfizer Dépo-Medrol
Vincristine (VCR)	Alcaloïde	1µg/mL	Sigma ; #V8879

Tableau 10 : Drogues utilisées in vitro durant la LC1.

A J7, le pourcentage de cellules apoptotiques est mesuré en CMF en utilisant l'iodure de propidium, un intercalant fluorescent de l'ADN, qui ne pénètre spontanément que dans les cellules apoptotiques perméables.

100µL de PBS / iodure de propidium (40µg/mL) sont rajoutés à 100µL de suspension cellulaire avant l'analyse par CMF.

### **6.1.5 Etude de la résistance des CIL NALM6 au 5-FU durant la LC1**

Les expériences *in vitro* suivantes ont été menées avec du 5-FU selon la méthodologie du paragraphe précédent.

A J7 de LC1, les 2 conditions contrôles (20% et 0,1% ; sans 5-FU) ou avec 5-FU (très apoptotiques) sont traitées selon la méthodologie suivante :

- Conditions avec du 5-FU : les suspensions cellulaires sont prélevées (2mL au total correspondant à 500 000 cellules implantées à J3), centrifugées et lavées 2 fois en milieu de culture RPMI 1640 (300g ; 5 minutes ; 20°C). Les cellules sont reprises avec 5 mL de milieu de culture d'entretien (cf paragraphe 6.1.2). La concentration cellulaire des suspensions traitées au 5-FU est ainsi ramenée à 100 000 cellules/mL équivalent à J3 de LC1 (100 000 éq.cellules/mL)
- Conditions contrôles : 500 000 cellules totales vivantes sont prélevées, centrifugées, lavées 2 fois et reprises avec 5 mL de milieu de culture. La concentration cellulaire des suspensions contrôles est de 100 000 cellules/mL.

L'objectif de cette méthode est de pouvoir comparer les CIL persistantes dans la LC1 en présence ou pas de 5-FU.

La présence de CIL résiduelle est mise en évidence par plusieurs méthodes décrites ci-dessous.

#### 6.1.5.1 Analyse de la capacité CRC des cellules résiduelles

Une CRC (Culture Repopulating Cell) est une cellule capable *in vitro* de repeupler une culture liquide, ici de reformer la lignée NALM6.

Les suspensions cellulaires lavées sont mises à incuber durant plusieurs semaines en condition « normoxique ». Cette nouvelle culture est appelée « culture liquide secondaire (LC2) ». La capacité CRC des cellules résiduelles est mesurée par comptage hebdomadaire avec une cellule de Malassez des suspensions cellulaires préalablement diluées dans une solution de PBS-Bleu Trypan (0,1% (m/v) ; Invitrogen ; #15250-061).

#### 6.1.5.2 Analyse de la capacité CFU des cellules résiduelles

Une CFU (Colony Forming Unit) est une cellule capable *in vitro* de proliférer pour former une colonie dans un milieu semi-solide. Chaque colonie a pour origine une CFU unique lorsque la concentration cellulaire d'implantation est adaptée.

A J0 de la LC2, 10 $\mu$ L (1 000  $\text{eq. cellules/mL}$ ) de suspension sont prélevés et ajoutés à 250 $\mu$ L de milieu semi-solide MethoCult™ (StemCell Technologies ; #H4230) préalablement déposés dans un puits d'une plaque 24 puits (pour les conditions contrôles sans 5-FU, seulement 100 cellules vivantes seront déposées par puits). Les colonies sont comptées à la loupe binoculaire après une incubation de 20 jours à 37°C dans une atmosphère saturée en eau, « normoxique » et à 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 6.1.5.3 Transplantation et suivi des souris xéno greffées

Les souris NSG (NOD.Cg-*Prkdc*<sup>scid</sup> *Il2rg*<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ ; Jackson Laboratory ; #005755) âgées de 8 à 10 semaines sont conditionnées par injection intrapéritonéale (à J-2 et J-1) de Busulfan (Busilvex ; 20mg/kg/injection). A J0 de la LC2, 100 $\mu$ L (10 000  $\text{eq. cellules}$ ) de la suspension cellulaire sont transplantés par souris par injection intraveineuse en retro-orbital.

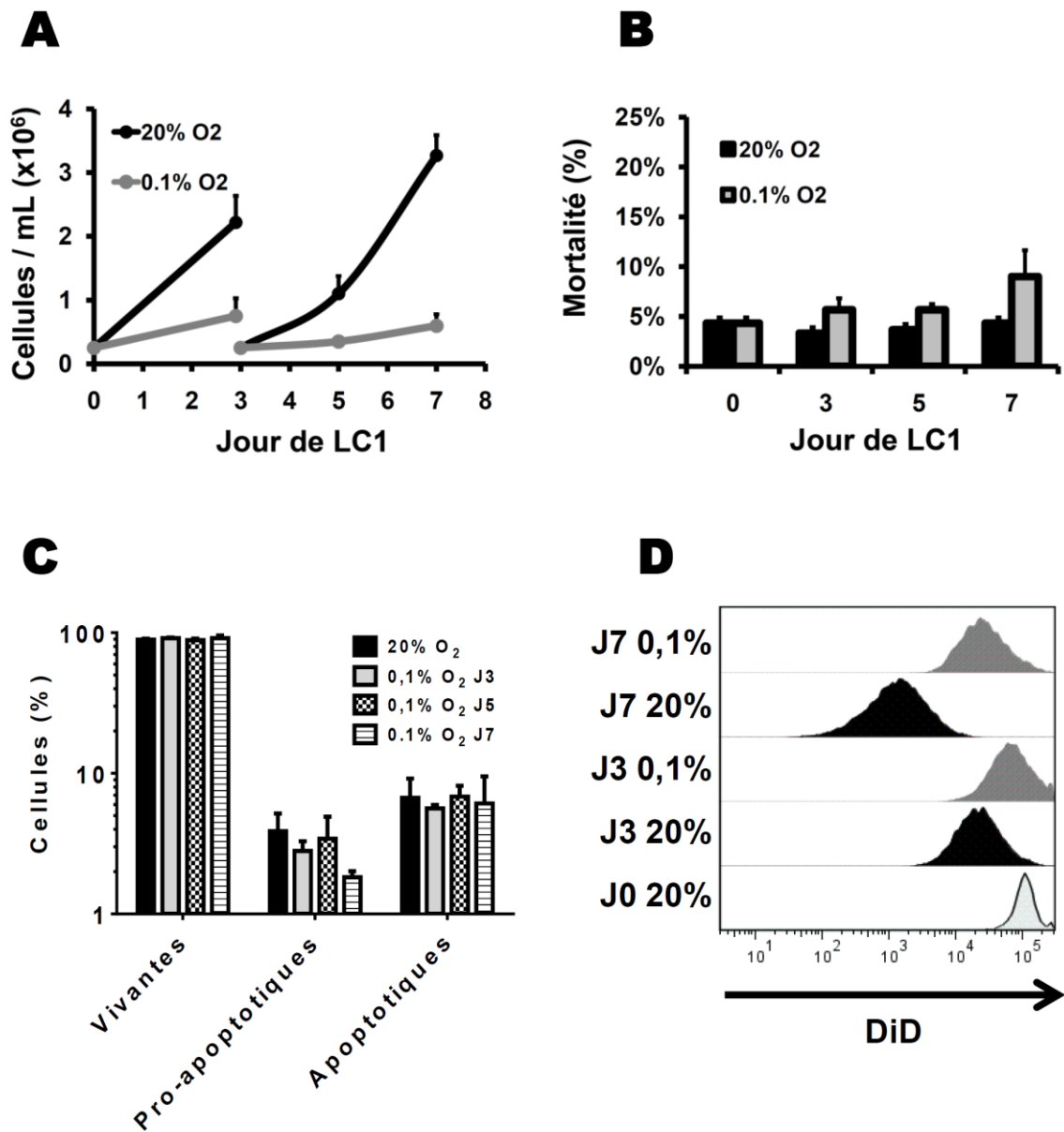
Les souris sont suivies visuellement tous les jours et sont sacrifiées lorsque le point limite d'expérimentation est atteint (selon les critères établis par Montgomery, 1990). Une recherche de cellules leucémiques NALM6 est systématiquement effectuée dans les tissus hématopoïétiques des animaux sacrifiés.

La moelle d'un fémur de l'animal est extraite avec une seringue munie d'une aiguille 26G remplie d'1mL de milieu IMDM 1% SVF. La rate est broyée sur un tamis de 70µm dans 3 mL de milieu. 50µL des suspensions cellulaires sont prélevés et lavés une fois au PBS (300g ; 5 minutes ; 20°C). Le culot cellulaire est remis en suspension et incubé 30 minutes à 4°C dans 25µL d'une solution de PBS contenant trois anticorps monoclonaux commerciaux dilués au 1/50 (tableau 11). Après centrifugation, les cellules sont remises en suspension 15 minutes à température ambiante dans une solution de lyse des hématies (BD Pharm Lyse ; #555899). Après deux lavages et resuspension en PBS, les cellules sont analysées en CMF.

Cellules cibles	Anticorps utilisés	Fluorochromes couplés	Fournisseurs	Réf.	Clones
NALM6	Anti-HLA-DR	FITC	Beckman Coulter	IM1638U	Immu-357
	Anti-CD10	APC	Beckman Coulter	IM3633	ALB1
Hématopoïétiques murines	Anti-mCD45	Pacific Blue	BioLegend	103126	30-F11

Tableau 11 : Anticorps utilisés pour identifier et compter les cellules NALM6 xéno greffées





**Figure 27 : La LC1 de 7 jours en hypoxie induit un ralentissement majeur de la prolifération de la lignée NALM6 sans augmentation de la mortalité cellulaire. A : Suivi de la prolifération cellulaire par comptage en cellule de Malassez (n=3) ; B : Suivi de la mortalité par comptage en cellule de Malassez au bleu trypan (n=3) ; C : Suivi de l'apoptose par marquage Annexin V – Iodure de Propidium (Analyse en CMF, n=4) ; D : Suivi de la prolifération cellulaire à J3 et J7 (Analyse en CMF de la décroissance de la fluorescence du DiD des cellules marquées à J0 ; expérience représentative ; n=4).**

## 6.2 Résultats

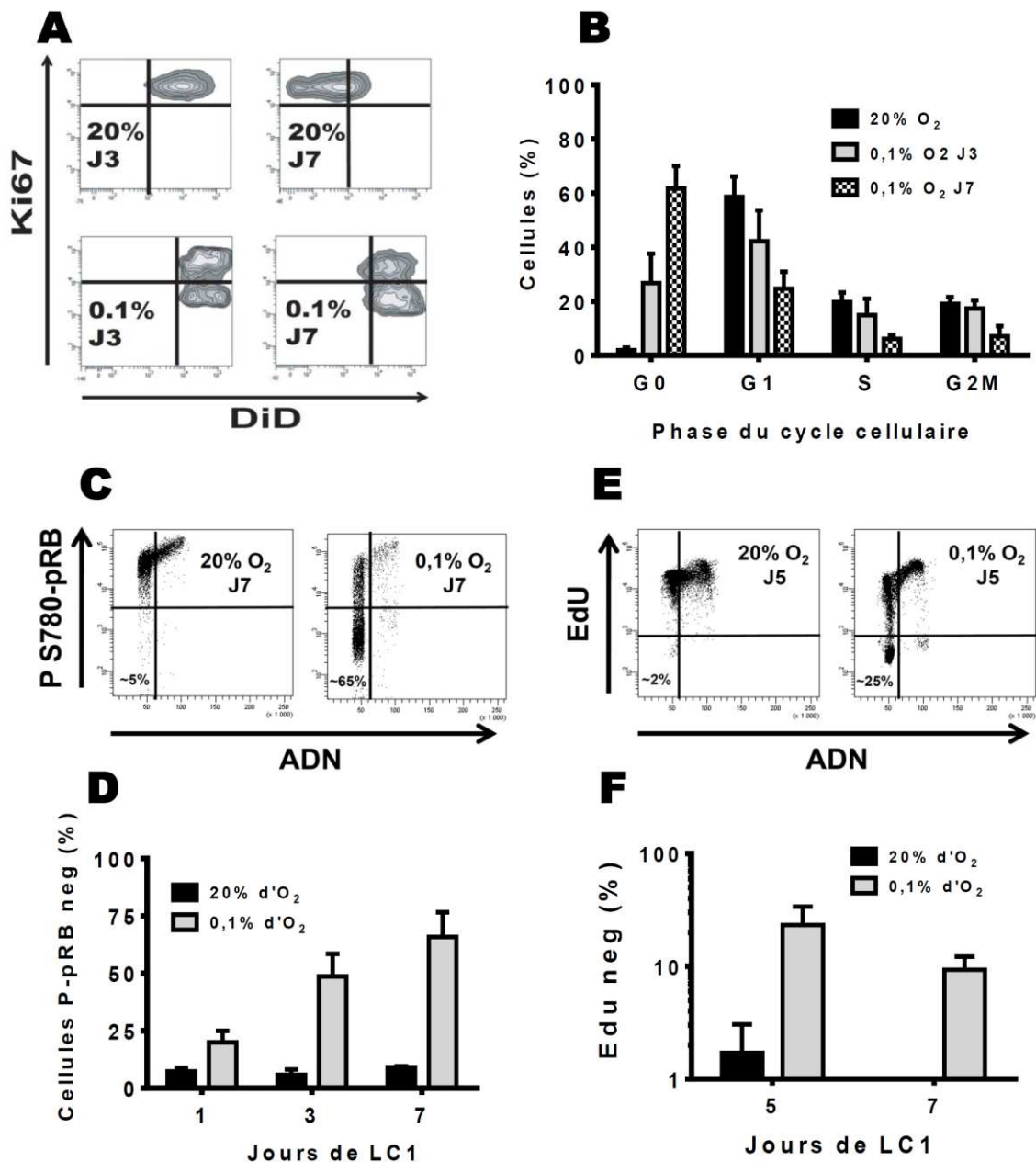
### **6.2.1 La culture de 7 jours en hypoxie induit un ralentissement de la prolifération sans augmentation de la mortalité cellulaire**

Nous nous sommes intéressés à l'effet que peuvent avoir les très faibles concentrations d'O<sub>2</sub> sur la prolifération et la mortalité cellulaire de la lignée NALM6 durant la LC1 (culture de 7 jours) (figure 27).

Le comptage au bleu trypan montre que les cellules NALM6 prolifèrent lors de la culture de 7 jours (LC1) à 0,1% d'O<sub>2</sub> mais avec un temps de doublement moyen croissant et supérieur à la culture à 20% d'O<sub>2</sub>. Il est de 47h durant les 3 premiers jours de culture puis de 78h durant les 4 derniers jours. Un temps de doublement constant de 24h de la lignée NALM6 à 20% d'O<sub>2</sub> est observé durant toute la LC1 (figure 27A).

L'analyse en bleu trypan de la mortalité cellulaire de la lignée NALM6 durant la LC1 à 0,1% d'O<sub>2</sub> montre une légère hausse du pourcentage de cellules marquées à 0,1% d'O<sub>2</sub> en fonction du temps qui atteint 9% de mortalité de la population cellulaire à J7 de LC1. La condition contrôle présente un taux de mortalité stable et inférieur à 5% durant toute la LC1 (figure 27B). Cette mortalité faible est confirmée par le test Annexin V qui ne montre pas de différence significative entre les cultures à 20% et à 0,1% d'O<sub>2</sub>. En moyenne 2,5% ( $\pm$  1%) et 6% ( $\pm$  1%) des cellules sont respectivement pro-apoptotiques et apoptotiques durant toute la culture à 0,1% d'O<sub>2</sub> (figure 27C).

Le ralentissement de la prolifération est aussi mis en évidence en suivant la décroissance de fluorescence des cellules marquées au DiD. Entre J3 et J7 de la LC1 à 20% d'O<sub>2</sub>, la comparaison des histogrammes indique que toutes les cellules se sont divisées. A 0,1% d'O<sub>2</sub>, les histogrammes obtenus à J3 et J7 sont partiellement superposables, confirmant le ralentissement de la prolifération. A J3 et J7, l'intensité de fluorescence de certaines cellules est identique à celle des marquages à J0. L'absence d'épaule à J7 ne permet pas d'identifier formellement une population ayant arrêté sa prolifération durant 4 jours (figure 27D).



**Figure 28 : Influence de l'O<sub>2</sub> sur le cycle cellulaire de la lignée NALM6 en fonction du temps de LC1 ; Analyse en CMF. A :** L'hypoxie diminue le nombre de divisions cellulaires entre les jours 3 et 7, Dot plot d'un double marquage Ki67 DiD (expérience représentative ; n=3) ; **B :** L'hypoxie induit la quiescence des cellules (marquage Ki67 TO-PRO 3 ; n=5) ; **C :** Analyse en CMF à J7 de la phosphorylation de la S780 de pRB (expérience représentative ; n=3) ; **D :** L'hypoxie augmente l'hypophosphorylation de la S780 de pRB (n=3) ; **E :** Analyse en CMF à J5 de l'incorporation de l'EdU après 2 jours d'incubation (expérience représentative ; n=3) ; **F :** L'hypoxie bloque l'entrée en phase S d'une partie de la population entre J3 et J7 (marquage EdU TO-PRO 3 ; n=3).

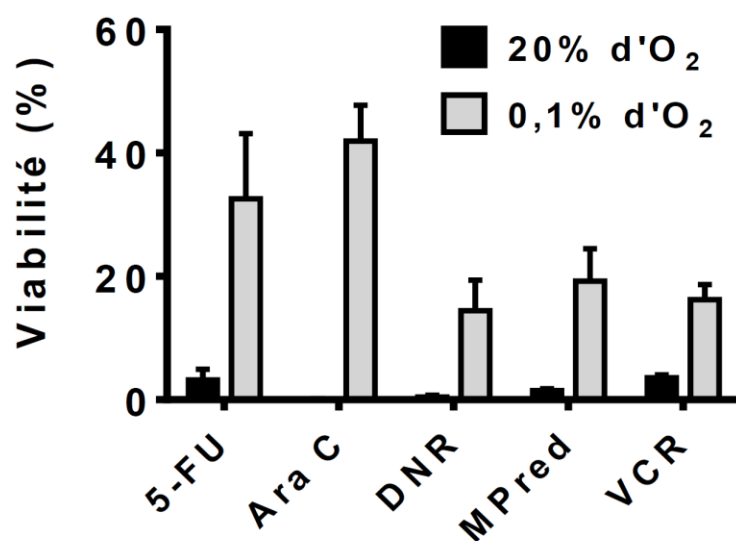
### **6.2.2 La culture de 7 jours en hypoxie induit la quiescence**

Le double marquage Ki67 DiD à J3 et J7 présenté en figure 28A montre que le ralentissement de la prolifération cellulaire à 0,1% d'O<sub>2</sub> durant les 4 derniers jours de LC1, est lié à une accumulation de cellules Ki67<sup>-</sup>, synonyme de quiescence. Cette accumulation est corrélée avec une diminution de la proportion des cellules dans les phases actives du cycle.

Durant la culture à 20% d'O<sub>2</sub>, peu de cellules sont quiescentes (2%). Les cellules sont majoritairement dans les phases actives du cycle cellulaire : G<sub>1</sub> (60%), S (19%) et G<sub>2</sub>M (19%). La culture à 0,1% d'O<sub>2</sub> entraîne une augmentation de la proportion de cellules quiescentes corrélée avec le temps d'incubation. Elle est de 25% à J3 et de 60% à J7 de LC1. La proportion des cellules dans les phases actives du cycle cellulaire G<sub>1</sub>, S et G<sub>2</sub>M diminue pour atteindre respectivement 25%, 6% et 7% en fin de LC1.

Afin de caractériser cette phase de quiescence, l'état de phosphorylation de la protéine du Rétinoblastome (pRB) a été étudié au cours de la LC1. Les résultats présentés figure 28C montrent une augmentation dès J1 de la proportion des cellules présentant la forme hypophosphorylée S780 de pRB. A 20% d'O<sub>2</sub>, la proportion de cellules présentant une hypophosphorylation de S780 de pRB est stable (7% en moyenne). A J3 et J7 de LC1 à 0,1% d'O<sub>2</sub>, elle atteint respectivement 50% et 65% des cellules totales. L'étude de l'état de phosphorylation S807/811 de pRB a aussi montré une diminution de la phosphorylation de pRB alors que l'expression de la protéine totale pRB est constante à 0,1% d'O<sub>2</sub> durant la LC1 (données non montrées).

La durée de la phase de quiescence des cellules est mise en évidence par une étude d'incorporation d'EdU (figure 28D et 28E). A 20% d'O<sub>2</sub>, les résultats confirment que toutes les cellules NALM6 de la culture se divisent au moins une fois dans les 96 heures suivant l'ajout de l'EdU à J3. A 0,1% d'O<sub>2</sub>, 25% des cellules ne sont pas entrées en phase S durant les 48h premières heures d'exposition à l'EdU. Cette proportion diminue à 10% durant les 4 derniers jours de la LC1 indiquant que seule une faible partie des cellules n'exprimant pas le Ki67 sont quiescentes entre J3 et J7.



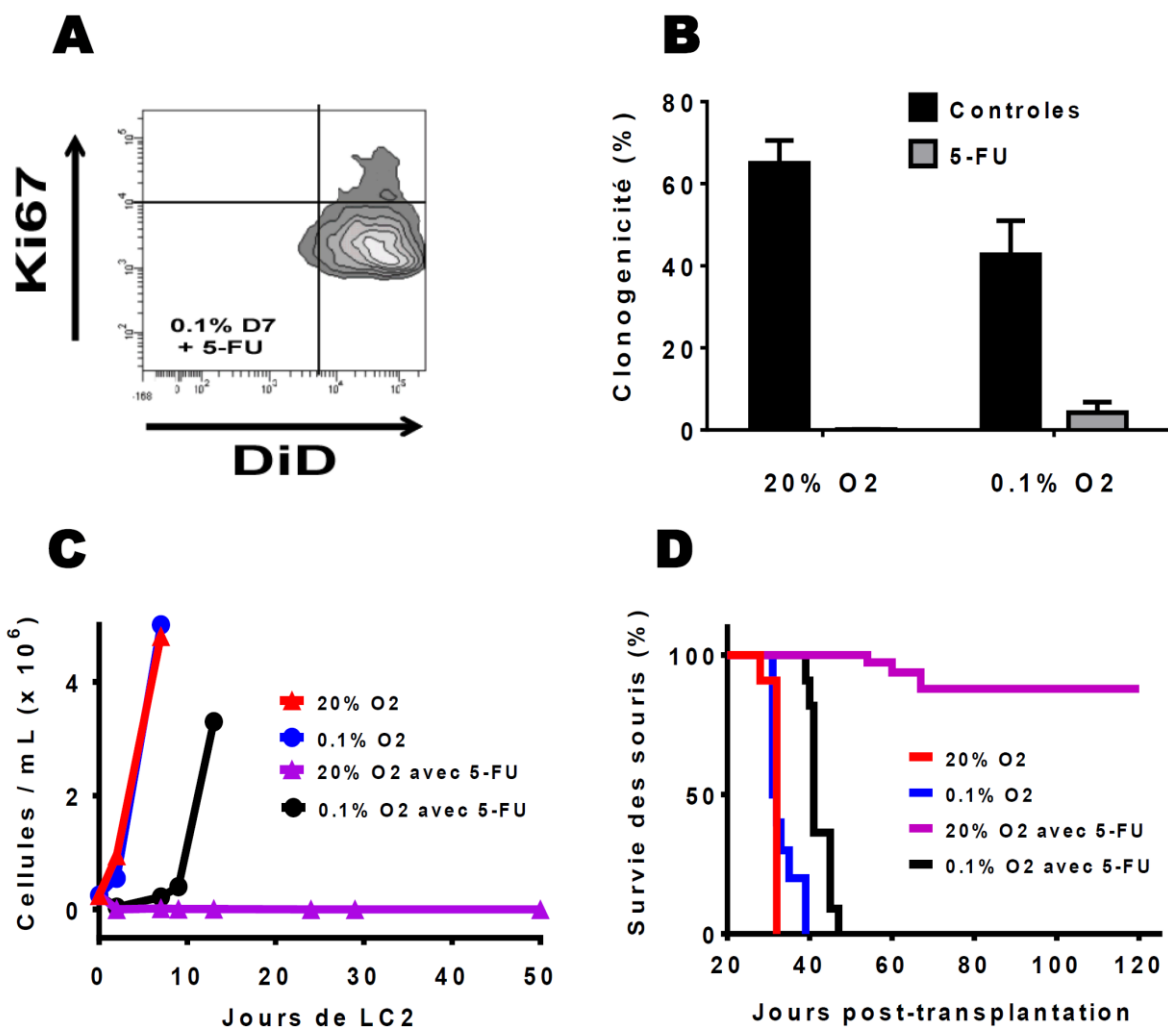
**Figure 29 : L'hypoxie (0,1% d'O<sub>2</sub>) induit une chimiorésistance de la lignée NALM6 entre J3 et J7 de LC1. La viabilité cellulaire est mesurée en CMF en comptant les cellules n'ayant pas incorporé d'iodure de Propidium (n=3). 5-FU : 5-Fluorouracile (25µg/mL); Ara C : Cytarabine (0,05µg/mL); DNR : Daunorubicin (0,1µg/mL); MPred : MethylPrednisolone (15µg/mL); VCR : Vincristine (1µg/mL).**

### **6.2.3 La culture en hypoxie induit une chimiorésistance**

Diverses études montrent une corrélation entre la résistance des leucémies et la quiescence cellulaire, nous avons cherché à déterminer si l'hypoxie pouvait jouer un rôle dans la résistance de la lignée NALM6 aux agents de chimiothérapie.

La figure 29 montre qu'à 0,1% d'O<sub>2</sub>, une forte proportion des cellules NALM6 résiste à l'exposition à différentes drogues durant les 4 derniers jours de la LC1. La viabilité cellulaire dépasse 30% lors de l'exposition au 5-FU ou à l'Ara C (antimétabolites qui ciblent préférentiellement les cellules durant la phase S du cycle). Elle est supérieure à 15% pour les cellules incubées avec la Daunorubicine (Anthracycline), la MéthylPrednisolone (Glucocorticoïde) et la Vincristine (Alcaloïde).

Contrairement aux précédents résultats à 0,1% d'O<sub>2</sub>, les cellules NALM6 cultivées à 20% d'O<sub>2</sub> montrent une très faible résistance aux drogues. Après 4 jours d'exposition, moins de 5% des cellules semblent viables quelle que soit la drogue utilisée.



**Figure 30 : L'hypoxie (0,1% d'O<sub>2</sub>) induit une résistance au 5-FU des CIL de la lignée NALM6 entre J3 et J7 de LC1.** A : Analyse en CMF à J7 de la quiescence (marquage Ki67 DiD) des cellules ayant résisté à une exposition au 5-FU entre J3 et J7 de LC1 (Dot plot représentatif ; n=3) ; B : L'hypoxie induit une résistance des CFC exposées au 5-FU entre J3 et J7 de LC1 (test de clonogénicité en milieu semi solide ; n=3) ; C : L'hypoxie induit une résistance des CRC exposées au 5-FU entre J3 et J7 de LC1 (test LC2 ; Expérience représentative ; n=4) ; D : L'hypoxie induit une résistance des CIL exposées au 5-FU entre J3 et J7 de LC1 (Courbe de survie des souris xéno greffées ; 11 souris / groupe ; n=2).

#### **6.2.4 La culture en hypoxie induit une résistance au 5-FU des CIL**

Les résultats de la figure 29 montrent une meilleure survie aux chimiothérapies des cellules NALM6 cultivées en hypoxie mais ils n'apportent aucun élément concernant leur capacité à ré-induire une prolifération cellulaire *in vitro* et *in vivo*. Ces CIL sont mises en évidence ou non par diverses expériences réalisées avec des cellules traitées ou non au 5-FU selon le même protocole. La figure 30A montre qu'à 0,1% d'O<sub>2</sub>, plus de 95% des cellules résiduelles ne se divisent pas et maintiennent un état de quiescence durant les 4 derniers jours de LC1.

La figure 30B montre que 65% des cellules NALM6 sont clonogènes lors de cultures à 20% d'O<sub>2</sub>. La culture de 7 jours à 0,1% d'O<sub>2</sub> (condition contrôle) préserve les deux tiers des CFC (40% de clonogénicité). Après 4 jours de culture en présence de 5-FU, 5% des CFC présentes à J3 sont conservées en hypoxie contre moins de 0,1% en normoxie.

Des résultats similaires sont obtenus par un test de repeuplement d'une LC2 (figure 30C). Aucune différence de reprise de prolifération n'est mise en évidence entre les deux conditions contrôles (LC1 à 20% et 0,1% d'O<sub>2</sub> sans 5-FU), montrant que la culture en hypoxie conserve aussi la majorité des CRC (Culture Repopulating Cells). Ces CRC retrouvent en LC2, la même cinétique de prolifération que les contrôles. Aucune reprise de prolifération n'est observée en LC2 quand la LC1 est faite à « 20% d'O<sub>2</sub> en présence de 5-FU » montrant que le 5-FU a éliminé toutes les CRC. La condition « 0,1% d'O<sub>2</sub> traitée 5-FU » montre un repeuplement de la culture très rapide à partir du cinquième jour de LC2 avec une cinétique de prolifération rejoignant celle des contrôles. Ceci indique qu'une partie des CRC cultivées en hypoxie a survécu au traitement.

Afin de mettre en évidence la présence de CIL NALM6 dans ces cultures, des expériences de transplantation post LC1 à des NSG ont été réalisées (figure 30D). Les résultats montrent une prise de greffe identique des cellules issues des deux conditions contrôles (20% et 0,1%) conduisant à la mort des animaux à J30 post-transplantation. Ces résultats indiquent que des cellules de la lignée NALM6 ont des propriétés de CIL qui sont maintenues lors d'une culture de 7 jours à 0,1% d'O<sub>2</sub>. La transplantation de cellules de la condition de LC1 « 20% d'O<sub>2</sub> traitée 5-FU » a provoquée la mort tardive (à J53, J60 et J67) de 3 animaux sur les 11 transplantées. Le traitement au 5-FU supprime les CIL lors d'une



LC1 à 20% d'O<sub>2</sub>. Toutes les souris transplantées avec des cellules issues de la condition « 0,1% d'O<sub>2</sub> traitée 5-FU » sont mortes sur une courte période entre J40 et J50. Ces résultats indiquent qu'une partie des CIL NALM6 survivent à un traitement continu de 4 jours par le 5-FU lorsqu'elles sont induites en quiescence par une culture à 0,1% d'O<sub>2</sub>.

### 6.3 Synthèse des résultats obtenus

Dans cette étude *in vitro*, nous montrons qu'une culture de 7 jours de la lignée de LAL « NALM6 » en hypoxie sévère (0,1% d'O<sub>2</sub>) n'induit aucune mortalité cellulaire mais provoque un fort ralentissement de la prolifération.

Ce ralentissement est dû à l'entrée en quiescence progressive des cellules NALM6. Cette quiescence est mise en évidence par l'absence d'expression de la protéine Ki67 ainsi que par une diminution de la phosphorylation de la protéine pRB. Entre le 3<sup>ème</sup> et le 7<sup>ème</sup> jour de culture, seule une faible proportion (~10%) des cellules ne se sont pas répliquées (EdU<sup>-</sup>) signifiant que l'hypoxie profonde (0,1% d'O<sub>2</sub>) induit à la fois une vraie quiescence et un très fort ralentissement du cycle actif.

Nous avons montré que la culture *in vitro* à 0,1% d'O<sub>2</sub> induit une chimiorésistance des cellules NALM6 à d'autres drogues. Suite au traitement au 5-FU, plus de 90% des cellules NALM6 résiduelles sont quiescentes confirmant le rôle protecteur de la phase G<sub>0</sub>. Les cultures secondaires en milieu liquide ou semi-solide ainsi que les tests de transplantation montrent que l'hypoxie induit la résistance au 5-FU de cellules NALM6 capables de reformer la lignée, autrement dit des CIL NALM6.

**7 Cellules NALM6 : Une partie de la population résiste *In vivo* à  
3 injections de 5-FU**

## 7.1 Matériel et méthodes

### 7.1.1 Transplantation de cellules NALM6 à des souris immunodéficientes

Les souris NSG (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ ; Jackson Laboratory ; # 005755) sont conditionnées par injections intrapéritonéales (à J-2 et J-1) de Busulfan (Busilvex ; 20mg/kg/injection) (figure 31). A J0, 10 000 cellules NALM6 sont transplantées aux souris (injection intraveineuse dans le sinus retro-orbitaire (Yardeni et al., 2011)).

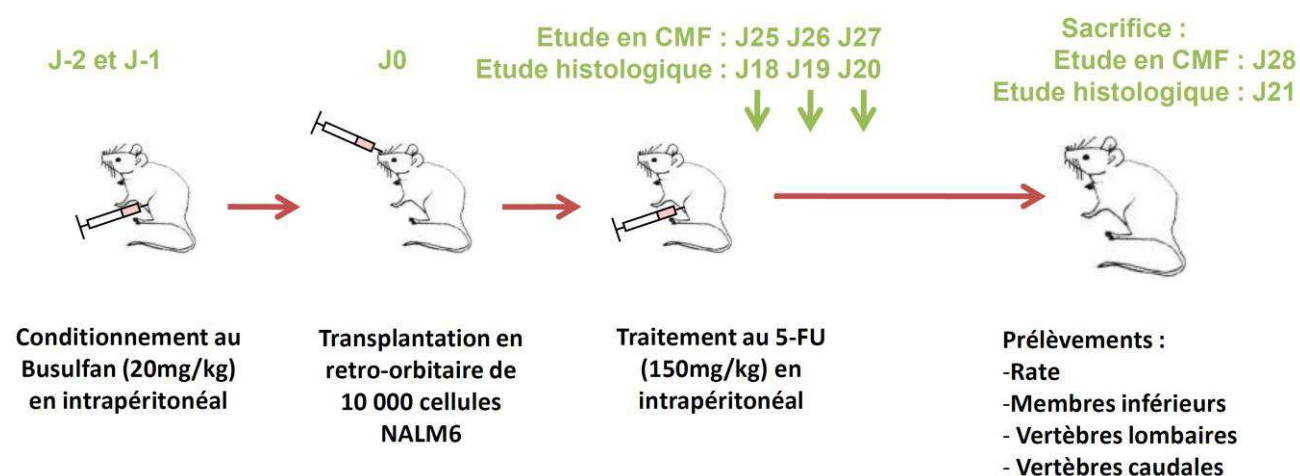


Figure 31 : Protocole de transplantation des cellules NALM6 dans la souris NSG

### 7.1.2 Sacrifice des animaux et analyse des tissus prélevés

- ✓ Etude préliminaire en CMF :

De J25 à J27, la moitié des animaux ont reçu 3 injections intrapéritonéales de 5-FU (150mg/kg/24 heures d'une dilution à 5mg/mL de 5-FluoroUracile Dakota).

Les animaux traités et contrôles non traités sont sacrifiés à J28, un fémur et la rate sont prélevés. La moelle d'un fémur de l'animal est extraite avec une seringue munie d'une aiguille 26G remplie d'1mL de milieu IMDM 1% SVF. La rate est broyée sur un tamis de 70µm dans du milieu IMDM 1% SVF. Ces suspensions cellulaires sont analysées après marquage en CMF.

- ✓ Etude histologique

Une expérience préliminaire d'histologie sur des souris sacrifiées à J28 a montré une infiltration trop importante de la moelle osseuse pour notre étude. De manière empirique, nous avons choisi de sacrifier les animaux à J21 pour les études histologiques.

A J18, 3 animaux sur 5 ont reçu 3 injections intrapéritonéales de 5-FU (150mg/kg/24 heures d'une dilution à 5mg/mL de 5-FluoroUracile Dakota). Les animaux traités (3 souris) et contrôles non traités (2 souris) ont été sacrifiés à J21. Le chimérisme a été contrôlé sur la moelle extraite d'un fémur de l'animal avec une seringue munie d'une aiguille 26G remplie d'1mL de milieu IMDM 1% SVF. L'autre membre inférieur entier, 3 à 4 vertèbres lombaires, 3 à 4 vertèbres caudales et la rate sont prélevés et immédiatement fixés pendant 3 jours dans 20 volumes d'une solution à 3,7% de formaldéhyde dans du PBS, par volume d'organe. **Les échantillons ont ensuite été envoyés pour analyse histologique au Dr F. Blanchard (U957 – Nantes), travaux auxquels j'ai participé.**

### **7.1.3 Etude en CMF du chimérisme humain NALM6**

Le contrôle du chimérisme est réalisé en CMF avec les anticorps anti-mCD45, anti-HLA-DR et anti-CD10 précédemment décrits (tableau 11). Les cellules extraites de la moelle sont lavées une fois au PBS (300g ; 5 minutes ; 20°C). Le culot cellulaire est remis en suspension et incubé 30 minutes à 4°C dans 25µL d'une solution de PBS contenant les trois anticorps monoclonaux. Après centrifugation, les cellules sont remises en suspension 15 minutes à température ambiante dans une solution de lyse des hématies (BD Pharm Lyse ; #555899). Après deux lavages et resuspension en PBS, les cellules sont analysées.

### **7.1.4 Etude préliminaire en CMF**

#### **7.1.4.1 Comptage des leucocytes médullaires**

Suite à une lyse des globules rouges de 10 minutes (Thrombo-TIC ; Bioanalytic, #004015-0007), les leucocytes murins et humains des moelles extraites sont comptés en cellule de Malassez.

#### **7.1.4.2 Etude de l'apoptose des cellules NALM6 greffées**

L'apoptose est évaluée en CMF (BD ; LSRFortessa) sur la population humaine (hCD10<sup>+</sup>mCD45<sup>-</sup> préalablement marquée) après un marquage à l'annexin V-Iodure de propidium (BD Biosciences ; #556547) suivant le protocole du fabricant.

#### **7.1.4.3 Etude de la quiescence des cellules NALM6 greffées**

250 000 cellules humaines médullaires et spléniques sont lavées une fois au PBS (300g ; 5 minutes ; 20°C). Le culot cellulaire est remis en suspension et incubé 30 minutes à 4°C dans 25µL d'une solution de PBS contenant l'anticorps Anti-HLA-DR (tableau 11). Après centrifugation (300g ; 5 min ; 20°C) les cellules sont remises en suspension et incubées à l'obscurité (45 min ; 4°C) dans 100µL d'une solution de fixation et perméabilisation extemporanée (H<sub>2</sub>O, 0,05% (m/v) Saponine, 0,4% (m/v) PFA, 10 mM HEPES). Après un double lavage (300g ; 5 min ; 20°C) en PBS additionné de 5% (v/v) de SVF, 2 mM d'EDTA, les cellules sont resuspendues et incubées (30 min ; 4°C) avec 10µL d'anticorps anti-Ki67-PE (BD Pharmingen ; #556026). Après lavage en PBS, les cellules sont reprises dans 250µL d'une solution de PBS additionnée de 1µM TO-PRO®-3 Iodide (Life Technologies ; #T3605) et analysées en CMF.

#### **7.1.5 Réalisation des coupes histologiques**

Après fixation, les tissus sont lavés en PBS, puis décalcifiés durant 48 heures avec le « KOS Microwave Histostation » (Milestone®, Kalamazoo, MI, USA) dans une solution de PBS contenant 4,13% d'EDTA et 0,2% de paraformaldéhyde. Les échantillons sont ensuite déshydratés puis inclus en blocs de paraffine. Les coupes sériées de 3µm d'épaisseur utilisées pour les différentes analyses histologiques sont réalisées avec un microtome Leica® RM2255.

#### **7.1.6 Colorations et marquages des coupes.**

Après déparaffinage et réhydratation, les coupes sériées sont colorées ou marquées par technique immunohistochimique et hybridation in situ.

##### **7.1.6.1 Coloration au Trichrome de Masson**

Cette coloration est réalisée par succession de bains d'hématoxyline de Groat, de Fuchsin Ponceau, d'Orange G molybdique et de Vert lumière. Après réhydratation des lames, le montage est réalisé en milieu non-aqueux. Cette coloration permet une étude morphologique de l'organisation et de la richesse tissulaire avant et après traitement par le 5-FU, avec notamment une révélation des fibres de collagène de l'os décalcifié en vert.

### 7.1.6.2 Détection immunohistochimique du Ki67 humain et de la caspase-3 clivée

Le protocole général pour ces marquages indirects (AC primaire puis secondaire) est indiqué ci-dessous. Les caractéristiques des anticorps utilisés sont indiquées dans le tableau 12. Chaque lavage est réalisé avec du tampon de lavage (3 x 5 minutes à Température Ambiante (TA) dans du TBS pH7,6 ; 0,05% Tween).

Après démasquage antigénique des coupes en tampon citrate pH 6 (5h à 76°C) puis lavages, les peroxydases endogènes sont bloquées avec de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (incubation de 15 minutes à TA).

Après lavages, les sites aspécifiques sont bloqués avec le tampon « bloquant » (tampon de lavage, 1% BSA et 5% sérum de chèvre) (25 min à TA), puis les coupes sont lavées et incubées toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires ou les contrôles isotypiques dilués (Colonne A) dans le tampon « bloquant ».

Colonne A	Colonne B	Colonne C	Colonne D
<b>Anticorps I<sup>aire</sup></b> <b>Clones</b> <b>Dilutions</b>	<b>Fournisseurs</b> <b>Références</b>	<b>Espèces</b> <b>reconnues</b>	<b>Anticorps II<sup>aire</sup></b> <b>Dilutions</b>
<b>Anti-Ki67</b> <b>MIB-1</b> <b>1/100</b>	<b>Dako</b> <b>M7240</b>	<b>Humain</b>	<b>Anti-IgG1 de souris</b> <b>1/200</b>
<b>Anti caspase 3 clivée</b> <b>5A1E</b> <b>1/400</b>	<b>Cell Signaling</b> <b>9664</b>	<b>Murin</b> <b>Humain</b>	<b>Anti-IgG de lapin</b> <b>1/300</b>

**Tableau 12 : Anticorps utilisés pour caractériser la prolifération et l'apoptose des cellules NALM6 en histologie**

Les coupes sont ensuite incubées après lavage avec l'anticorps secondaire biotinylé dilué (colonne D) (30 min ; 37°C) dans le tampon « bloquant ».

Après de nouveaux lavages, les coupes sont incubées avec une streptavidine/peroxydase (P0397 ; Dako) diluée au 1/200 dans le tampon de lavage (30 min ; 37°C).

Ces coupes sont lavées et révélées au DAB (diaminobenzidine ; Dako) à l'obscurité (1 à 10 minutes ; TA) en contrôlant visuellement la cinétique afin de limiter le bruit de fond. La réaction est stoppée par lavage à l'eau bidistillée. Une contre coloration est faite à l'Hématoxyline de Gill 2. Elle permet de faire ressortir les noyaux en bleu-violet. Afin de conserver en bon état les coupes, une lamelle est collée sur la coupe en milieu de montage non-aqueux (Eukitt).

### **7.1.6.3 Détection des séquences Alu humaines par hybridation in situ.**

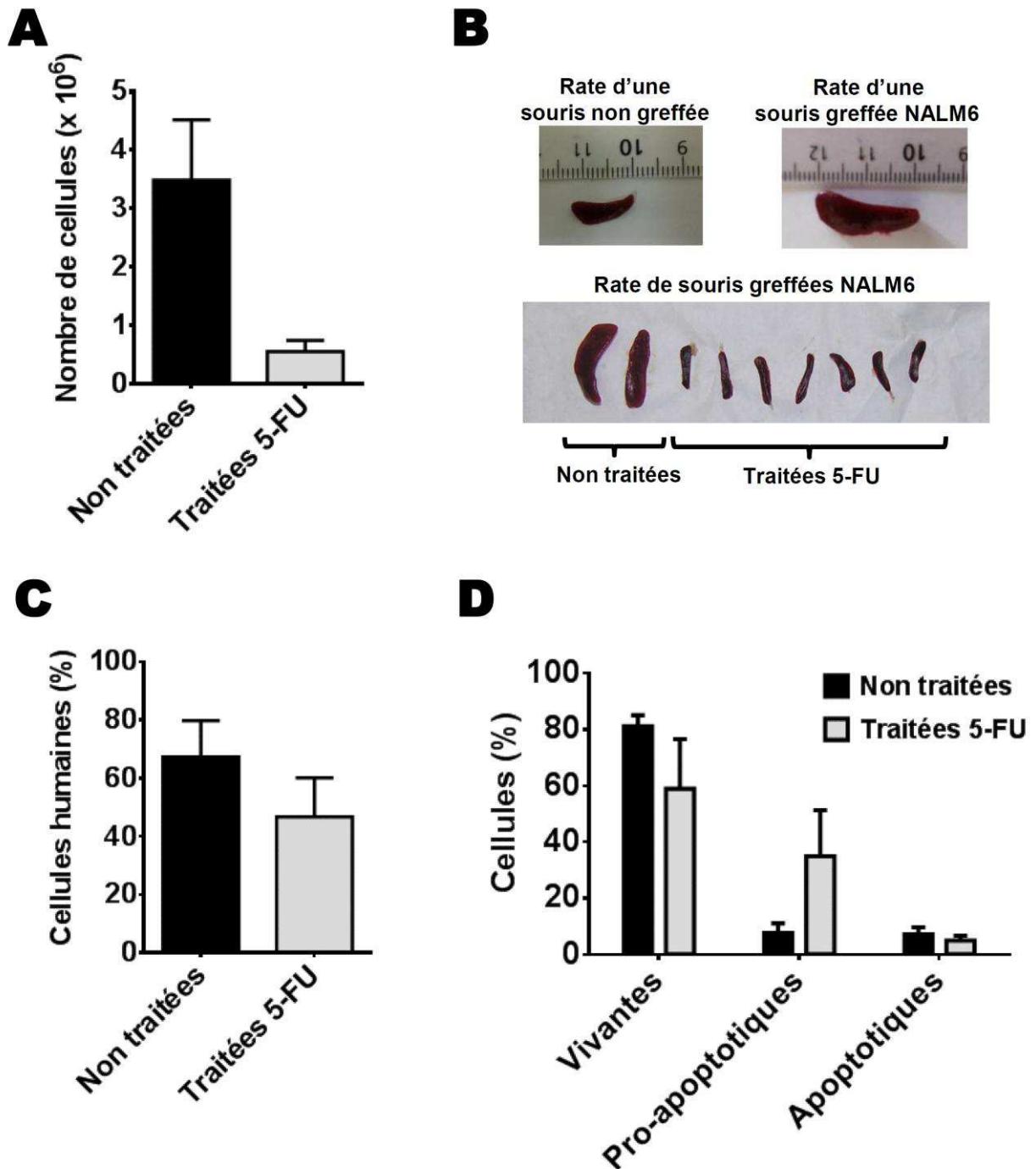
Après un déparaffinage et une ré-hydratation par des bains graduels en éthanol, les coupes sont lavées 3 fois (5min) en TBS-Tween 0,05% (pH 7,6) sous légère agitation. Les lames sont ensuite traitées pendant 15mn à TA avec une solution d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% puis lavées 3 fois avec du TBS-Tween 0,05%. Les coupes sont alors traitées pendant 10min à 37°C à la protéinase K (10µg/mL (P2308, Sigma Aldrich, France)) puis lavées 3 fois (5min) au TBS-Tween 0,05% avant d'être agitées durant 20min à TA dans une solution contenant 0,25% d'acide acétique et 0,1M de Tri-éthanolamine (pH 8). L'étape de pré-hybridation consiste en une incubation de 3h à 56°C dans le tampon d'hybridation (4X SSC (S6639, Sigma Aldrich France) ; 50% formamide dé-ionisé ; 1X Denhardt's solution ; 5% sulfate de dextran ; 100µg/mL d'ADN de sperme de saumon et H<sub>2</sub>O de grade moléculaire). L'hybridation se fait en chambre humide à 56°C pendant 19h dans du tampon d'hybridation contenant 70nM de sonde Alu couplée à la digoxine (5DigN/TCTCGATCTCCTGACCTCATGA/3Dig\_N ; Exiqon, Vedbaek, Denmark) et l'ADN cible, préalablement dénaturé pendant 5min à 95°C. Les coupes sont ensuite lavées 2 fois (10mn) toujours à 56°C dans du 2X SSC puis 3 fois dans du TBS-Tween 0,05%. La spécificité de l'hybridation est accrue par une incubation de 90mn à TA dans du TBS-Tween 0,05% complété avec 2% de BSA. La détection de la sonde Alu se fait par immunochimie en utilisant un anticorps biotinylé anti-digoxine (Jackson Immunoresearch, Baltimore, USA) dilué 200 fois dans du TBS-Tween 0,05 % + BSA 2%. Après une incubation de 35mn à 37°C, les coupes sont lavées 3 fois à TA dans du TBS-Tween 0,05%, puis incubées 45mn à 37°C dans une solution contenant TBS-Tween 0,05% + streptavidine conjuguée peroxydase. Après addition de Diaminobenzidine

(Dako), les coupes sont colorées avec de l'hématoxyline de Gill 2 (Thermo Shandon Ltd, Runcorn, UK), déshydratées puis montées en utilisant du Pertex (HistoLab Products AB, Sweden).

### **7.1.7 Observation des lames**

Les lames sont directement scannées à un grossissement x400 avec un appareil spécifique (NanoZoomer - Hamamatsu), enregistrées et analysées avec le logiciel NDP view2 qui offre la possibilité de mesurer précisément les territoires d'intérêt.





**Figure 32 :** 3 injections de 5-FU à des souris NSG xéno greffées NALM6 induisent une cytopénie médullaire et splénique sans diminution majeure du chimérisme médullaire. A : Comptage du nombre total de leucocytes humains et murins dans un femur de souris traitée ou non au 5-FU (n=1 ; 5 souris par groupe) ; B : Photo à J28 de rate de souris non transplantée et xéno greffée traitée ou non au 5-FU ; C : Analyse à J28 du chimérisme humain dans la moelle des souris traitées ou non au 5-FU (Analyse en CMF ; n=2 ; 8 souris par groupe) ; D : Suivi de l'apoptose à J28 des cellules humaines xéno greffées dans des souris traitées ou non au 5-FU (marquage Annexin V – Iodure de Propidium analysé en CMF ; n= 1 ; 5 souris par groupe).

## **7.2 Etudes préliminaires en CMF : Les cellules NALM6 résiduelles sont non apoptotiques et quiescentes**

Dans ces expériences préliminaires, l'effet du 5-FU sur les cellules NALM6 xéno greffées est étudié par CMF. Les animaux préalablement traités ou non au 5-FU sont sacrifiés à J28 post-transplantation.

### **7.2.1 Le 5-FU induit chez la NSG une cytopénie médullaire et splénique**

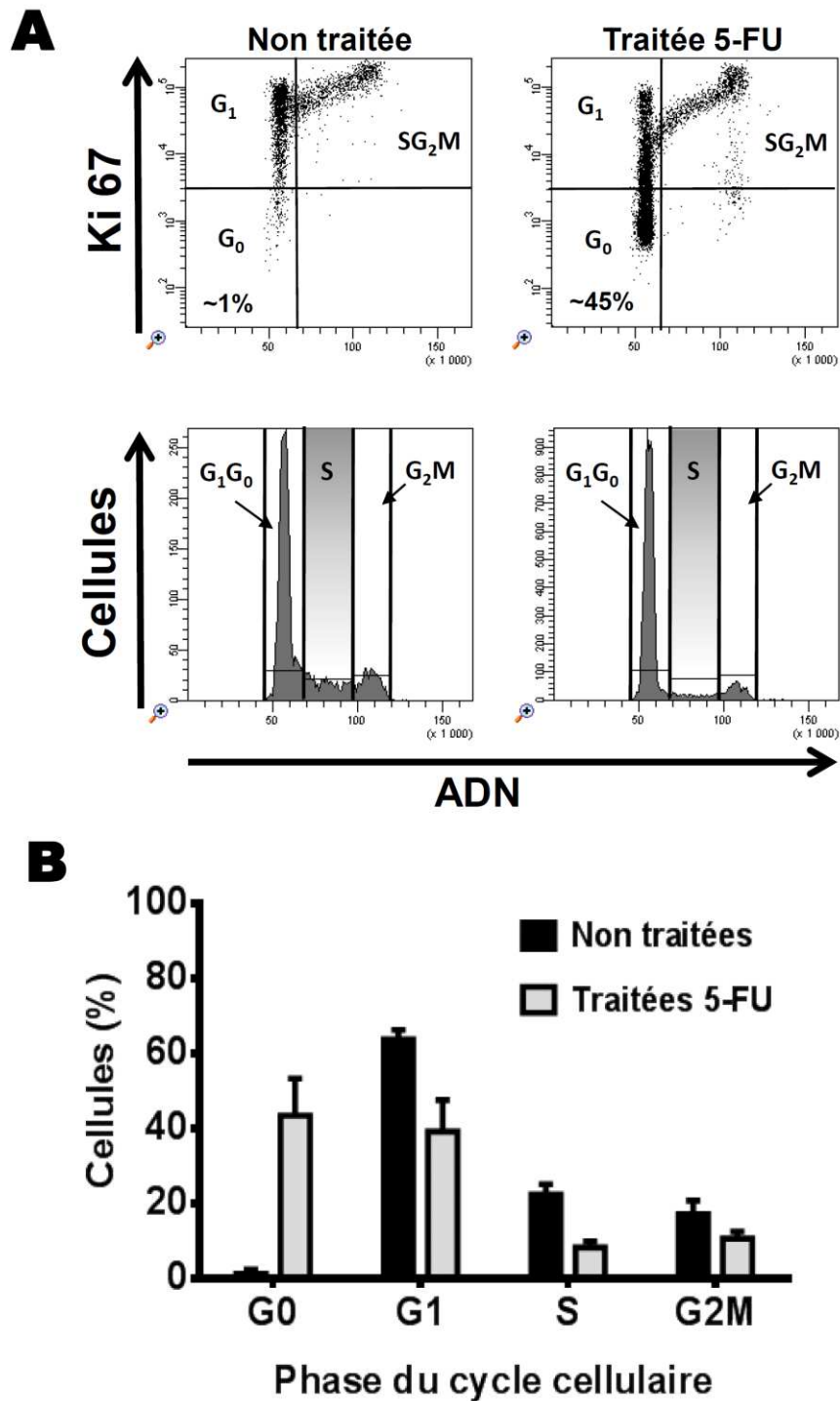
Le comptage de la moelle fémorale des souris immunodéficiences xéno greffées et non traitées montre une cellularité très faible, de seulement  $3,5 \cdot 10^6$  leucocytes totaux en moyenne. La triple injection de 5-FU aux souris induit une cytopénie importante des fémurs murins. Le nombre de leucocytes comptés par fémur chute pour atteindre  $0,5 \cdot 10^6$  cellules totales (figure 32A).

L'effet du 5-FU est aussi visible sur la morphologie des rates (figure 32B). La rate d'une souris NSG de 12 semaines mesure en moyenne 1cm. 28 jours post transplantation NALM6, les rates des souris de 12 semaines sont très infiltrées, ont doublé de taille pour atteindre en moyenne 2 cm de longueur. Suite à l'injection de 5-FU, une cytopénie splénique est visible qui se traduit par une diminution majeure de la taille des rates (devenant inférieure à celle des souris non greffées).

### **7.2.2 Le 5-FU cible préférentiellement les cellules NALM6 et en induit partiellement l'apoptose.**

La figure 32C montre une diminution de la proportion des cellules NALM6 qui passe de 65% à 45% de chimérisme humain dans la moelle osseuse des souris traitées au 5-FU et sacrifiées à J28. Ceci suggère une cytolysse plus importante des cellules NALM6. Toutefois, ces résultats indiquent que 225 000 cellules NALM6 résistent en moyenne *in vivo* à trois injections de 5-FU, ce qui correspond à 10% des cellules NALM6 d'une souris non traitée.

Le marquage des leucocytes médullaires à l'Annexin V, suivi d'une analyse en CMF de la population humaine, montre une augmentation significative de la fraction des cellules pro-apoptotiques, qui passe de moins de 10% à plus de 30%, au détriment de la fraction des



**Figure 33 :** Les cellules xéno greffées de NALM6 résistantes à 3 injections de 5-FU sont majoritairement quiescentes. A : Exemple d'analyse en CMF à J28 du cycle cellulaire des cellules humaines résiduelles de souris traitées ou pas au 5-FU (marquage Ki67 TO-PRO 3 ; expérience représentative ; n=2). B : Cycle cellulaire de la population humaine résiduelle de souris traitées ou pas au 5-FU (marquage Ki67 TO-PRO 3 ; n=2 ; 8 souris par groupe).

cellules vivantes lors du traitement des souris NSG au 5-FU (figure 32D). Aucune modulation de la fraction des cellules apoptotiques n'est observée suggérant une élimination rapide des cellules mortes par l'organisme de la souris.

### ***7.2.3 Les cellules NALM6 quiescentes résistent mieux au traitement par le 5-FU.***

Cherchant à montrer qu'une partie de la population NALM6 xéno greffée est quiescente, une étude en CMF de l'état du cycle (marquage Ki67 TO-PRO 3) des cellules humaines greffées est réalisée sur des souris traitées ou pas au 5-FU et sacrifiées à J28. La figure 33A montre deux exemples (une souris traitée et une souris non traitée) d'analyse du cycle cellulaire de la population humaine résiduelle par CMF.

L'analyse montre que la majeure partie des cellules NALM6 xéno greffées sont dans des phases actives du cycle cellulaire à J28 post-transplantation (figure 33B). En moyenne, 1% de la population cellulaire est quiescente, ce qui représente environ 20 000 cellules NALM6 totales. La distribution des cellules greffées dans les différentes phases du cycle rappelle fortement celle retrouvée dans les cellules NALM6 cultivées à 20% d'oxygène (figure 28B).

Suite au traitement par le 5-FU, on constate une augmentation de la proportion des cellules quiescentes. 45% des cellules humaines résiduelles sont quiescentes, ce qui correspond à 100 000 cellules humaines totales environ. Inversement, la proportion de cellules dans les autres phases du cycle diminue.

La transplantation des moelles totales de souris traitées au 5-FU induit une leucémie NALM6 à des receveurs secondaires (données non montrées). Ces résultats suggèrent qu'une partie des cellules NALM6 résiduelles sont des CIL.



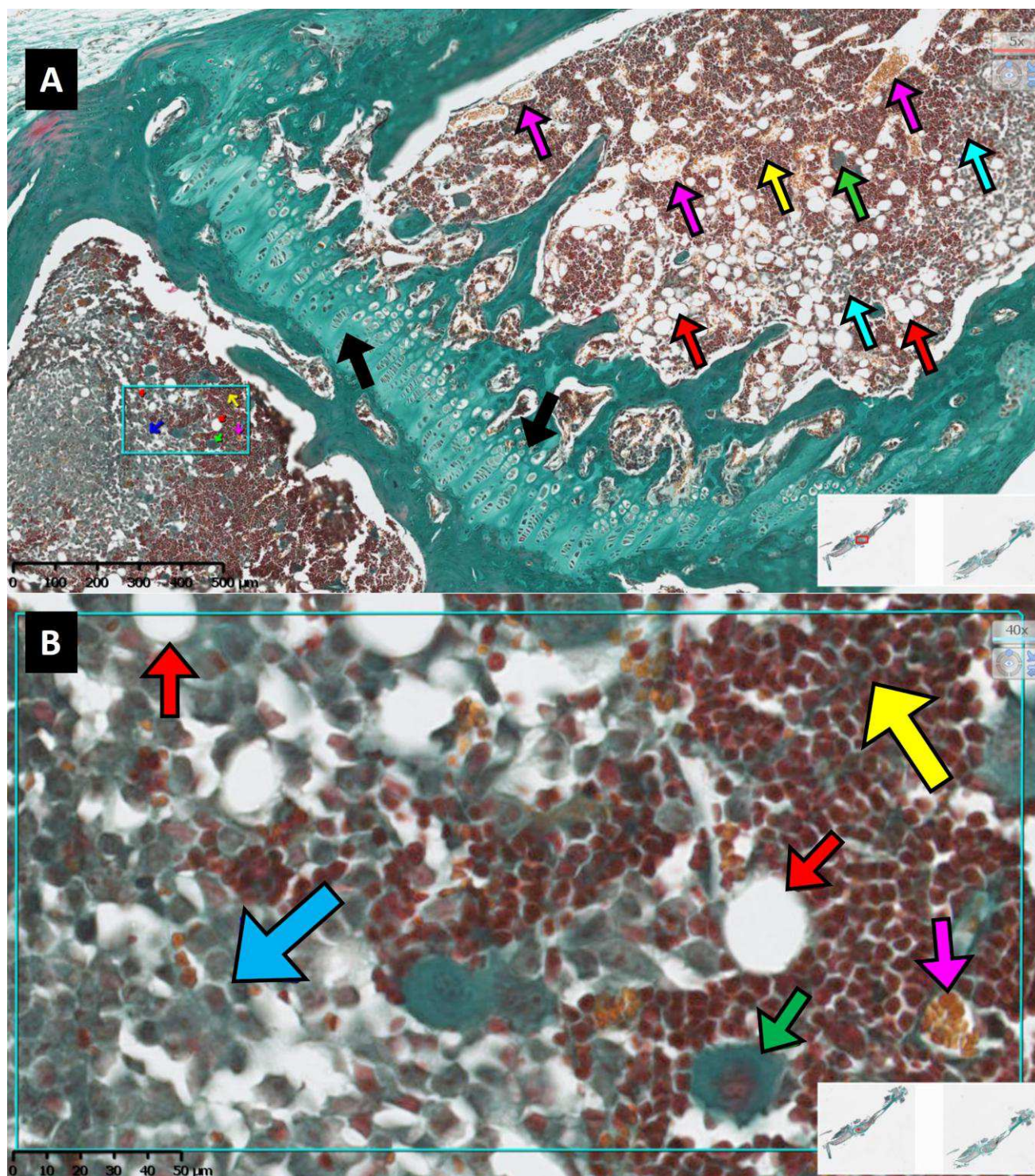


Figure 34 : Coupe sagittale de la TBA distale d'un fémur 21 jours après transplantation de cellules NALM6 (coloration au Trichrome de Masson) (x50 : photo A ; x400 : Photo B ; chimérisme de 10%) : flèches : - vertes : Mégacaryocytes, - jaunes : leucocytes murins, - rouges : adipocytes, - bleues : cellules humaines, - roses : vaisseaux contenant des hématies, noir : plaque de croissance.

### **7.3 Résultats : Etude histologique**

Une expérience préliminaire d'histologie sur des souris sacrifiées à J28 a montré une infiltration trop importante de la moelle osseuse pour notre étude. De manière empirique, nous avons choisi de sacrifier les animaux à J21 pour les études histologiques.

A ce jour, l'analyse des tissus prélevés et préparés est encore en cours. Seuls les marquages des tissus fémoraux (les plus aboutis) seront discutés dans cette partie.

Les résultats en CMF ont confirmé pour toutes les souris, un chimérisme blastique de 5 à 20% à J21.

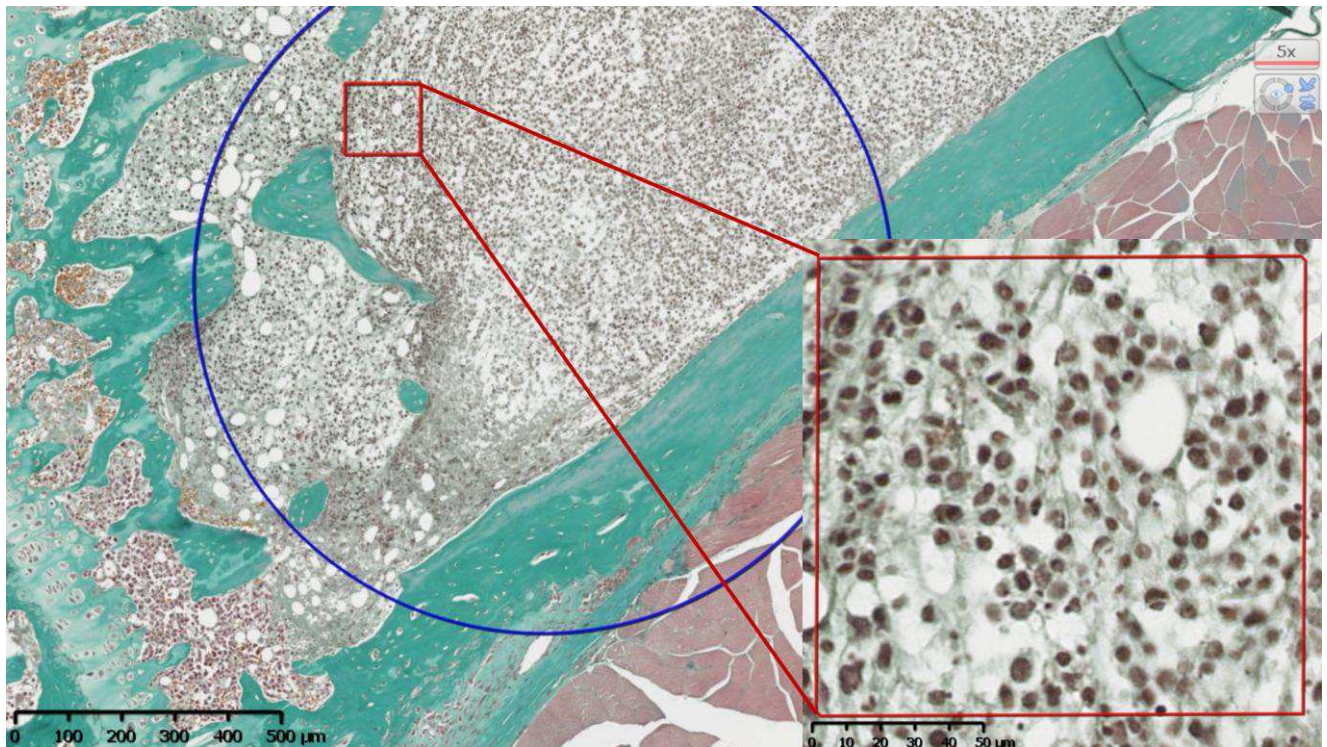
#### ***7.3.1 Aspect général d'une coupe de fémur après coloration au Trichrome de Masson***

##### **7.3.1.1 Aspect d'un fémur de souris leucémique non traitée (contrôle) à J21**

Les images de la figure 34 montrent une structure classique de moelle osseuse murine chimérique, envahie à 10% environ par les cellules leucémiques humaines NALM6. Les tissus osseux et le collagène sont colorés en vert lumière. Le territoire plus clair, avec des travées contenant des empilements de chondrocytes correspond à la plaque de croissance (flèches noires). De part et d'autre de la plaque de croissance, on distingue de la moelle osseuse murine (épiphysaire et metaphysaire) normale avec des leucocytes murins (flèches jaunes), des mégacaryocytes murins (flèches vertes) et des adipocytes (flèches rouges). La moelle est irriguée par de nombreux vaisseaux contenant des hématies (flèches roses).

Sur cette coupe, certaines cellules de plus grande taille, de morphologie homogène et souvent organisées en « amas » plutôt compacts prennent la coloration différemment et apparaissent de couleur grisâtre (flèches bleues). Le marquage des séquences ALU humaines, présenté dans le paragraphe suivant, révélera que ces cellules sont des blastes humains.



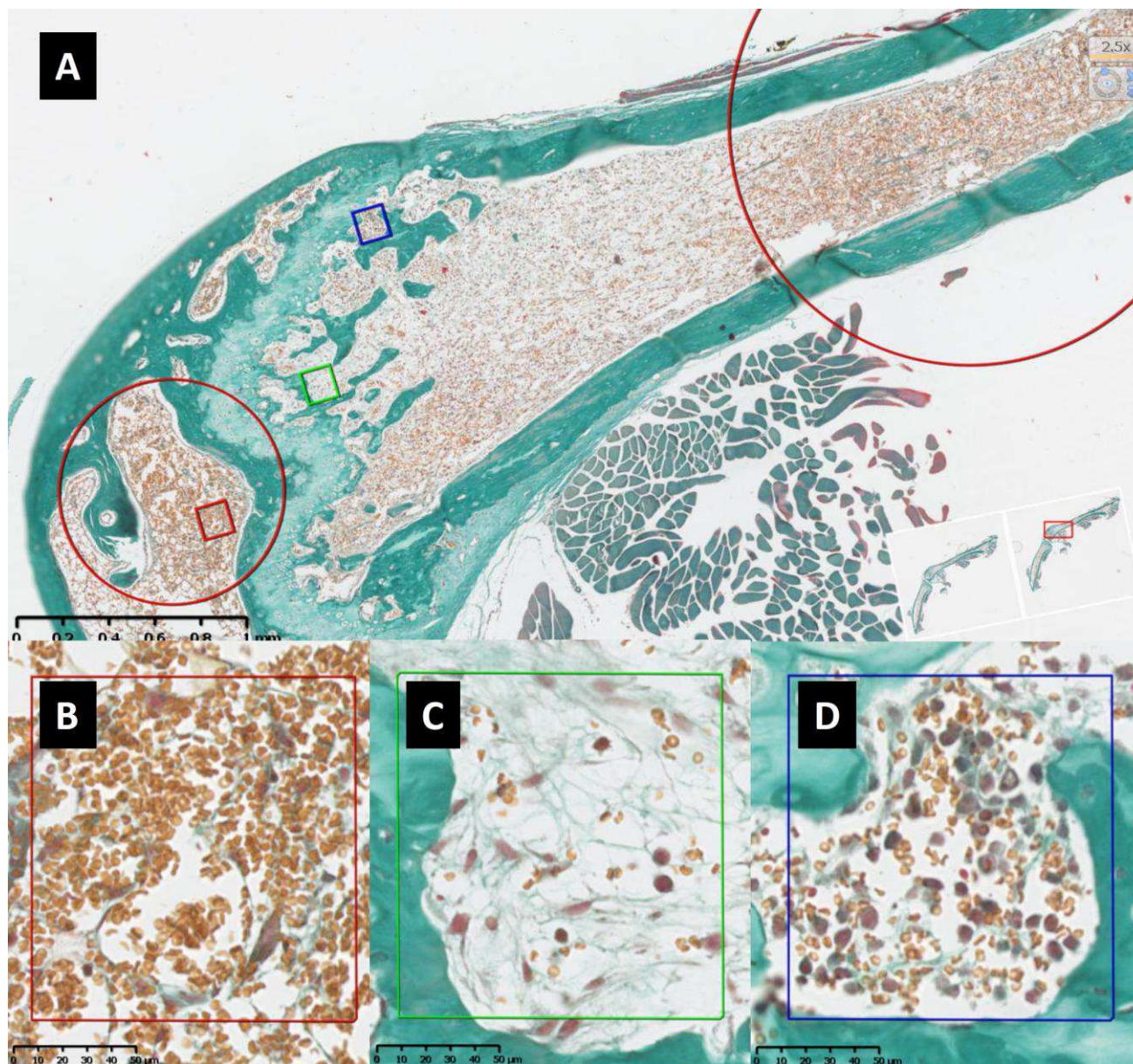


**Figure 35 : Coupe sagittale de la métaphyse distale d'un fémur 30 jours après greffe (coloration au Trichrome de Masson) (chimérisme >95%). Le cercle bleu entoure un territoire où aucune vascularisation n'est observée, l'agrandissement x400 correspond à la zone encadrée en rouge sur l'image au x50.**

**7.3.1.2 Aspect d'un fémur de souris leucémique non traitée à J30  
(coloration au Trichrome de Masson)**

La coupe présentée figure 35 montre la moelle osseuse d'une souris sacrifiée 30 jours après transplantation lors d'une expérience préliminaire unique. L'hématopoïèse normale murine n'est plus visible. Le fut fémoral est occupé à plus de 95% par des blastes humains qui forment une nappe cellulaire assez lâche de teinte grisâtre (cercle bleu), On n'identifie ni vaisseau, ni hématies sur ces coupes, ce qui suggère une hypoxie importante de ces tissus *in vivo*.



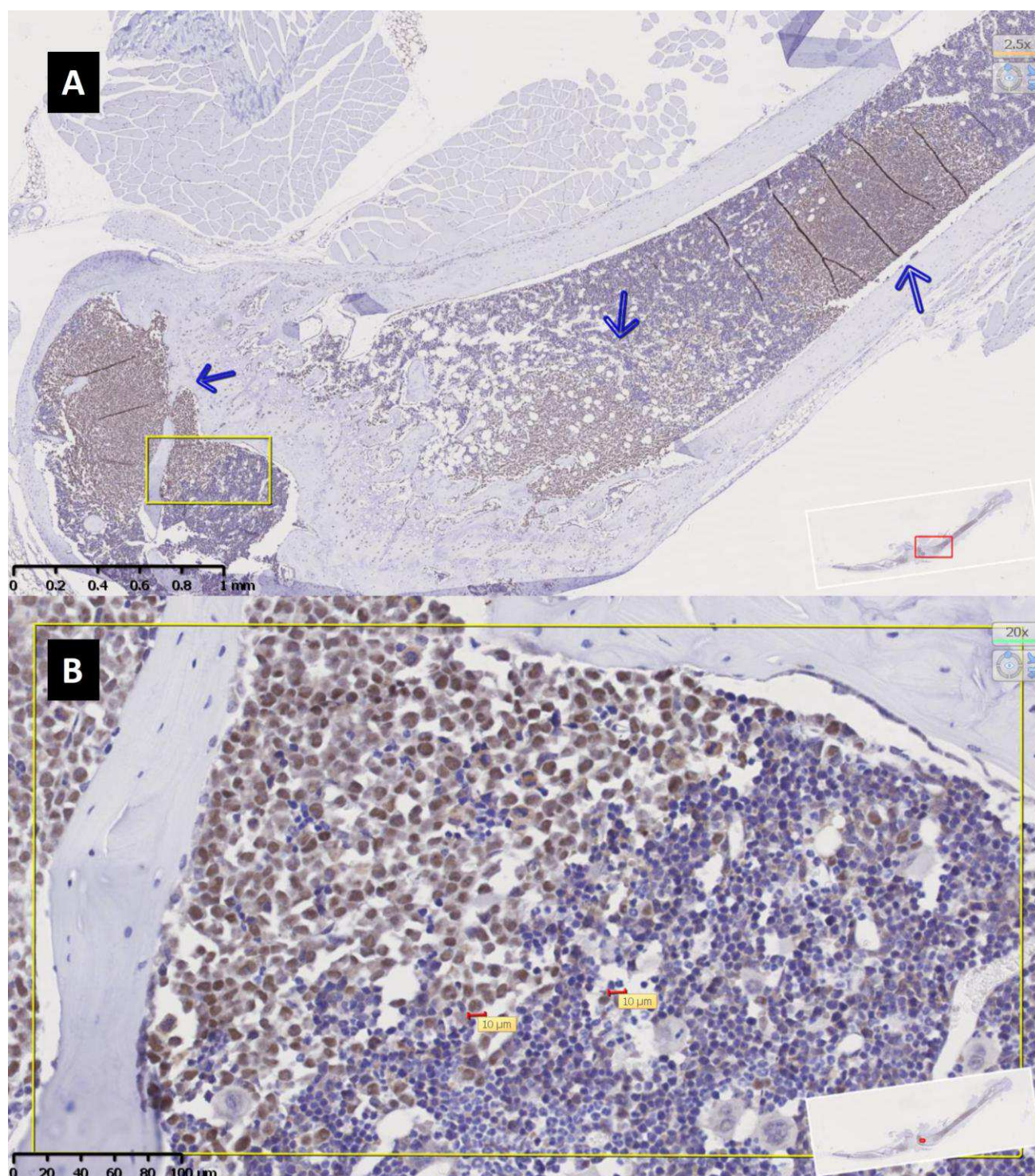


**Figure 36 : Coupe sagittale de la TBA distale d'un fémur 21 jours après transplantation et traitement au 5-FU (coloration au Trichrome de Masson) (x25 ; chimérisme de 5% ; coloration au Trichrome de Masson). Photo A, Les cercles rouges montrent des territoires de suffusion hémorragique. Les carrés identifient les zones qui sont présentées à plus fort grossissement dans les photos B, C et D. Photo B (x400), le rectangle rouge est un agrandissement de la suffusion hémorragique. Photo C (x400), le rectangle vert montre un territoire peu cellularisé. Photo D (x400), le rectangle bleu cadre un territoire de forte densité cellulaire relative.**

**7.3.1.3 Aspect d'un fémur de souris leucémique traitée au 5-FU, à J21 (coloration au Trichrome de Masson)**

Comme le montre la figure 36, le traitement de la souris au 5-FU entraîne une cytopénie médullaire majeure, portant à la fois sur la population murine et humaine (photo C). On observe aussi des suffusions hémorragiques massives (nombreuses hématies murines extravasculaires ; cercles rouges et photo B) témoignant d'un remaniement du tissu médullaire très rapide et important. Quelques rares territoires médullaires plus riches en cellules persistent, témoignant d'une meilleure résistance au 5-FU (Photo D).





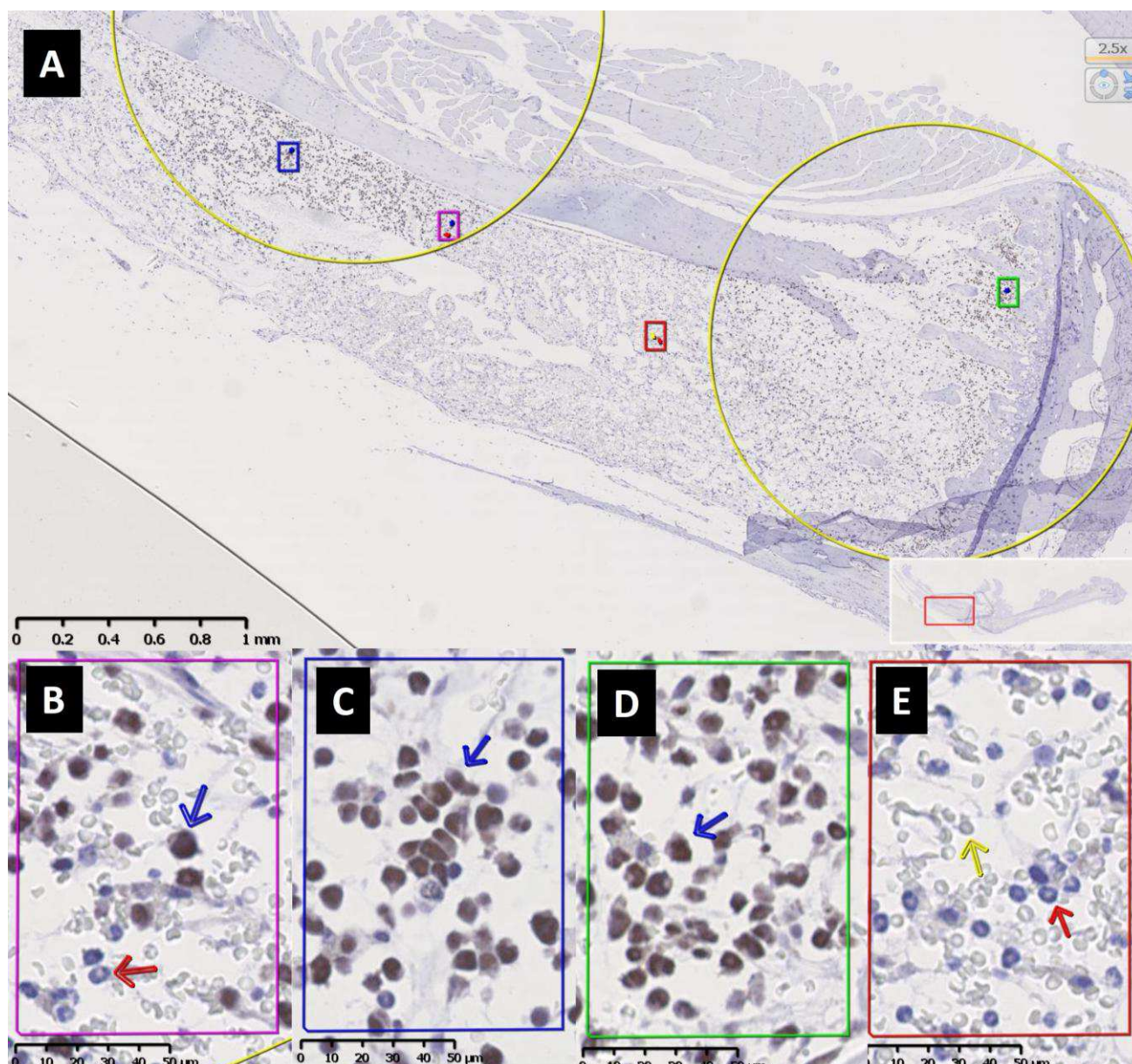
**Figure 37 : Coupe sagittale de la TBA distale d'un fémur 21 jours après transplantation (marquage ALU) (chimérisme de 10%). Les séquences ALU spécifiques des cellules humaines sont révélées par une coloration brune des noyaux. Photo A : grossissement x25, les flèches bleues montrent des territoires très infiltrés par les cellules humaines. Photo B : grossissement x200, 2 marqueurs de taille de 10µm ont été ajoutés.**

### **7.3.2 Détection des cellules humaines par hybridation in situ ALU**

#### **7.3.2.1 Aspect d'un fémur de souris leucémique non traitée, à J21.**

Les séquences ALU permettent de révéler spécifiquement les cellules humaines (noyaux cellulaires colorés en brun) après hybridation avec des sondes spécifiques. La contre coloration à l'hématoxyline de Gill 2 donne une couleur bleue-violette aux noyaux des cellules murines. La vue d'ensemble du fémur d'une souris 21 jours après transplantation (chimérisme à 10%) présentée dans la figure 37 (Photo A), montre des « amas homogènes » distincts de cellules humaines, dispersés dans le fut fémoral au sein d'une moelle hématopoïétique murine persistante. Cette distribution en amas suggère que l'envahissement médullaire murin se fait de façon clonale à partir de blastes isolés implantés. La photo B montre dans le même champ à un grossissement X200 des blastes humains de grande taille et bruns (8 à 10µm) et des leucocytes murins (5µm environ) plus petits et bleus.



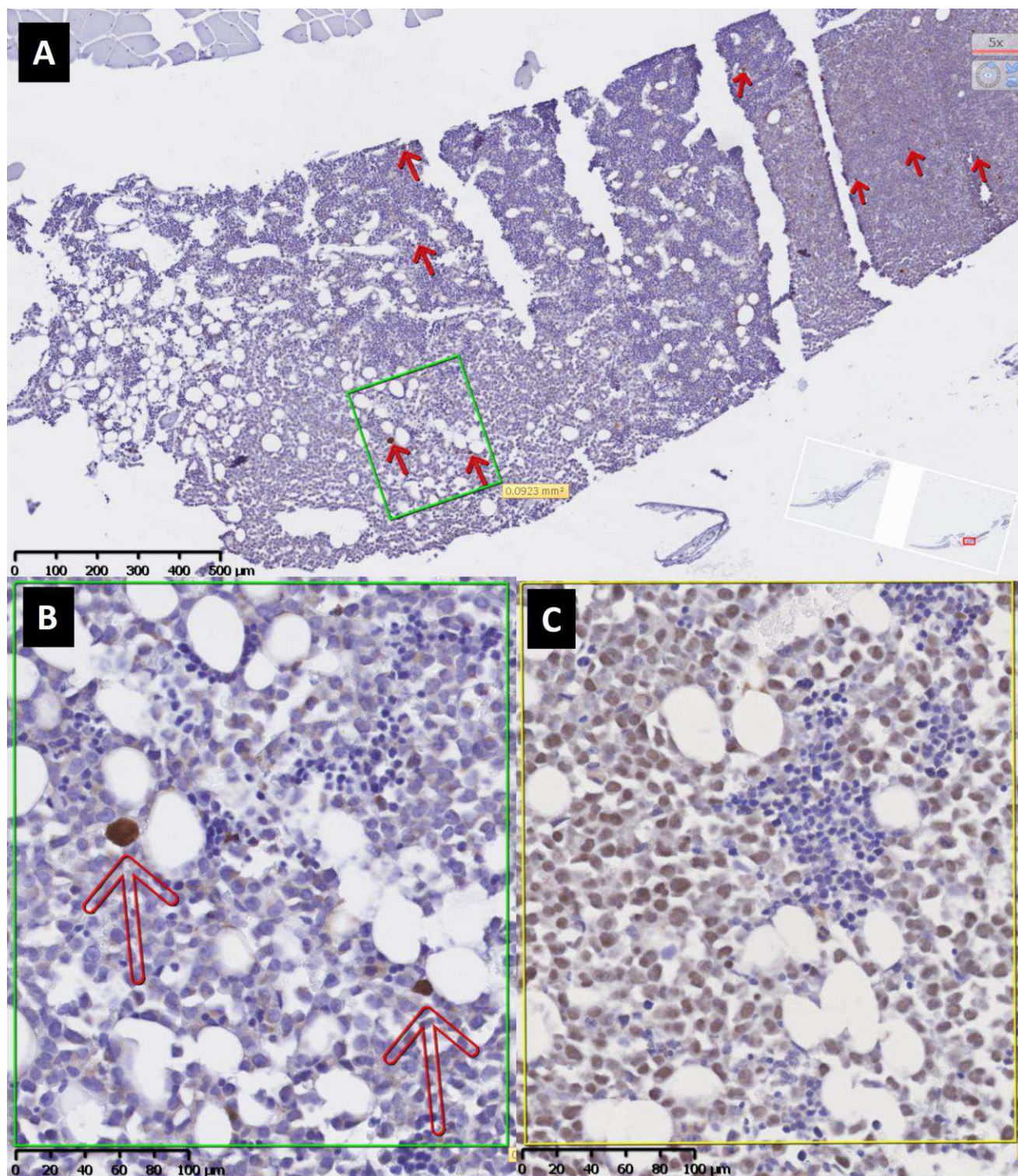


**Figure 38 : Coupe sagittale de la métaphyse proximale d'un tibia après traitement au 5-FU, 21 jours après transplantation (marquage ALU) (5% de chimérisme). Les séquences ALU des cellules humaines sont révélées en brun. Photo A : grossissement x25, les cercles jaunes indiquent des territoires de marquage ALU. Photo B : grossissement x400 d'une zone frontière entre un amas cellulaire humain et la moelle murine résiduelle, Photo C et D : grossissement x400 de deux territoires denses en cellules humaines, Photo E, grossissement x400 d'un territoire non envahi par les cellules humaines. Les flèches bleues et rouges indiquent respectivement des exemples de cellules humaines et murines, la flèche jaune montre un exemple d'hématie.**

**7.3.2.2 Aspect d'un fémur de souris leucémique traitée au 5-FU, à J21 (hybridation in situ ALU)**

La figure 38 montre la structure de la moelle d'une souris chimérique à 5% après traitement au 5-FU. Des « plages » de cellules brunes humaines résiduelles (ALU<sup>+</sup>) sont observables sur la photo A (cercles jaunes). Un agrandissement d'une zone frontière (photo B) permet d'identifier les cellules résiduelles humaines (flèches bleues) et les cellules murines (flèches rouges). Quelques territoires présentent des densités de cellules humaines importantes (photo C et D). Le tissu hématopoïétique murin résiduel non envahi présente des densités cellulaires moins importantes (photo E).





**Figure 39 : Coupe sagittale de la métaphyse distale d'un fémur, 21 jours après transplantation (marquage Caspase 3 clivée) (10% de chimérisme). Photo A et B : respectivement grossissement x50 et x200 ; le marquage brun, signalé par des flèches rouges, révèle les cellules apoptotiques.**

**Photo C : grossissement x200 du même territoire d'une coupe sériée. Les cellules humaines, brunes sont révélées grâce à un marquage des séquences ALU. Les noyaux des cellules murines sont bleus.**

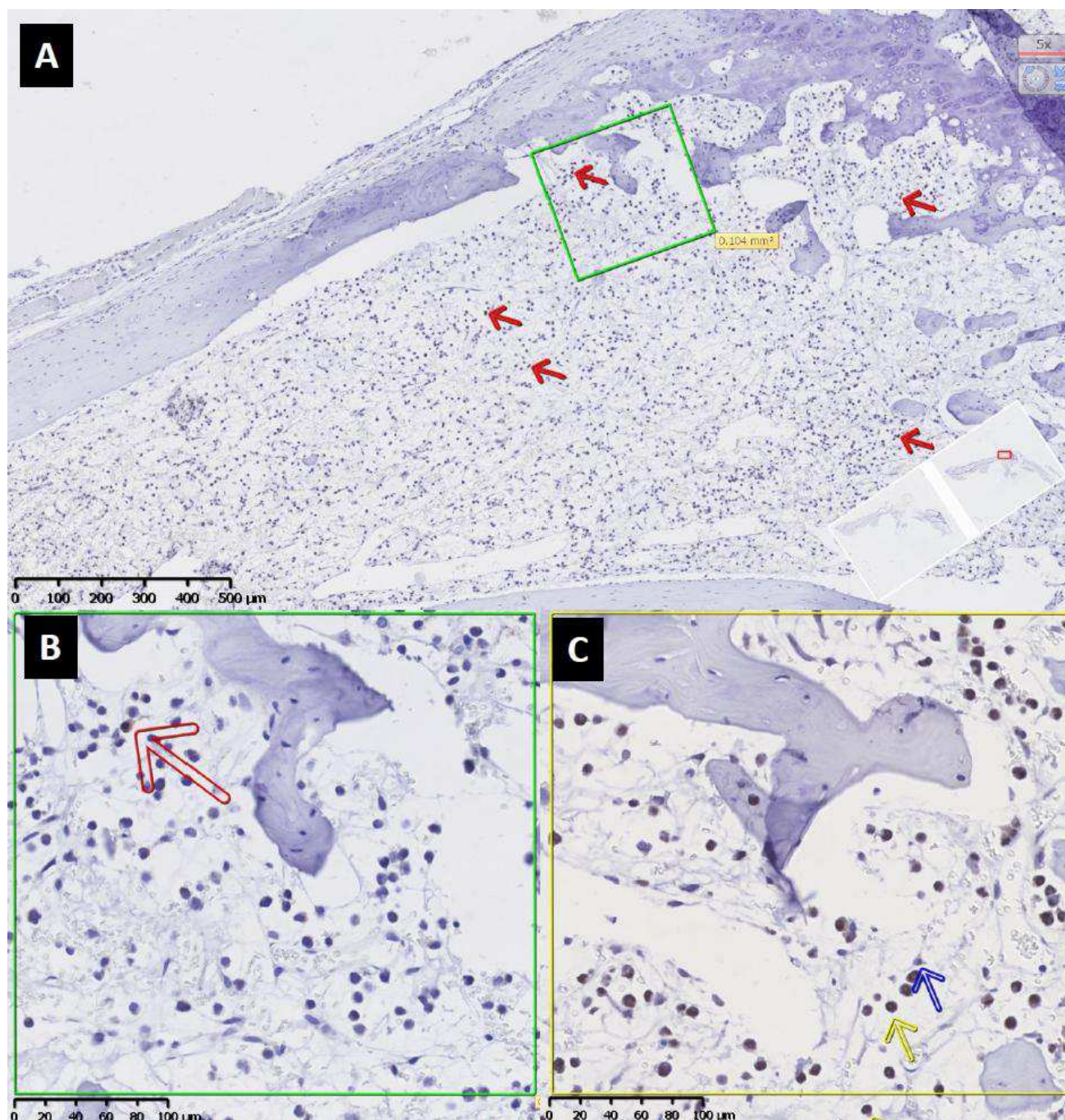
### **7.3.3 Analyse immunohistochimique par l'anti-Caspase 3 clivée, de l'apoptose des cellules humaines, avant et après traitement au 5-FU**

#### **7.3.3.1 Aspect d'un fémur de souris leucémique non traitée, à J21**

Sur la vue d'ensemble du fémur (photo A - figure 39), et sur la vue agrandie (x200 ; photo B - figure 39), très peu de cellules sont marquées à l'anti-caspase 3 clivée (flèches rouges). Le marquage des séquences ALU des cellules d'une même zone sur une coupe proche (photo C - figure 39) confirme que ce territoire est envahi par des cellules humaines NALM6 qui survivent et se développent dans cet environnement.

Les cellules humaines et murines d'une souris transplantée à J21 sont donc majoritairement non apoptotiques.



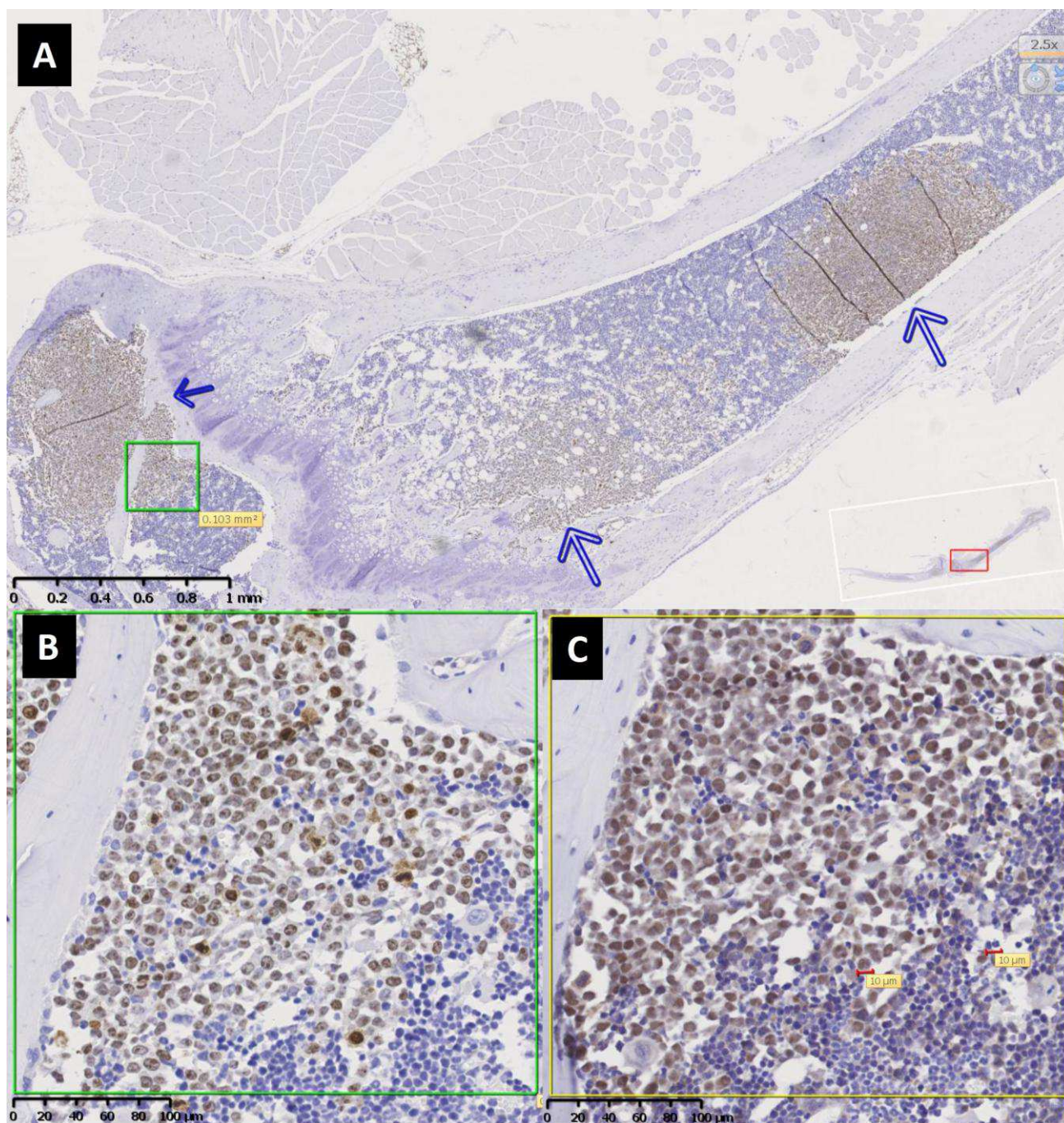


**Figure 40 : Coupe sagittale de la métaphyse distale d'un fémur 21 jours après transplantation et traitée au 5-FU (marquage Caspase 3 clivée) (chimérisme de 5%).** Photo A et B: respectivement grossissement x50 et x200 ; le marquage brun, signalé par des flèches rouges, révèle les quelques cellules apoptotiques. Photo C : grossissement x200 de la même zone d'une coupe sériée. Les cellules humaines, brunes sont révélées grâce à un marquage des séquences ALU (flèche jaune). Les cellules murines sont bleues (flèche bleue).

**7.3.3.2 Aspect d'un fémur de souris leucémique traitée au 5-FU, à J21 (anti-Caspase 3 clivée)**

La vue générale x50 (photo A – figure 40) ainsi qu'un agrandissement x200 (photo B – figure 40) du fémur de cette souris montrent un effet majeur du 5-FU sur la cellularité médullaire et un très faible contingent de cellules marquées par l'anti-caspase 3 clivée (flèches rouges). La majorité des cellules résiduelles humaines et murines sont donc non apoptotiques seulement 12 heures après la dernière dose de 5-FU. La photo C (x200) confirme la présence d'une majorité de cellules humaines dans le territoire étudié.





**Figure 41 : Coupe sagittale de la TBA distale d'un fémur de NSG, 21 jours post transplantation (marquage Ki67) (chimérisme de 10%).** Photo A et B: respectivement grossissement x25 et x200 ; le marquage brun, signalé par des flèches bleues, révèle les cellules exprimant le Ki67.

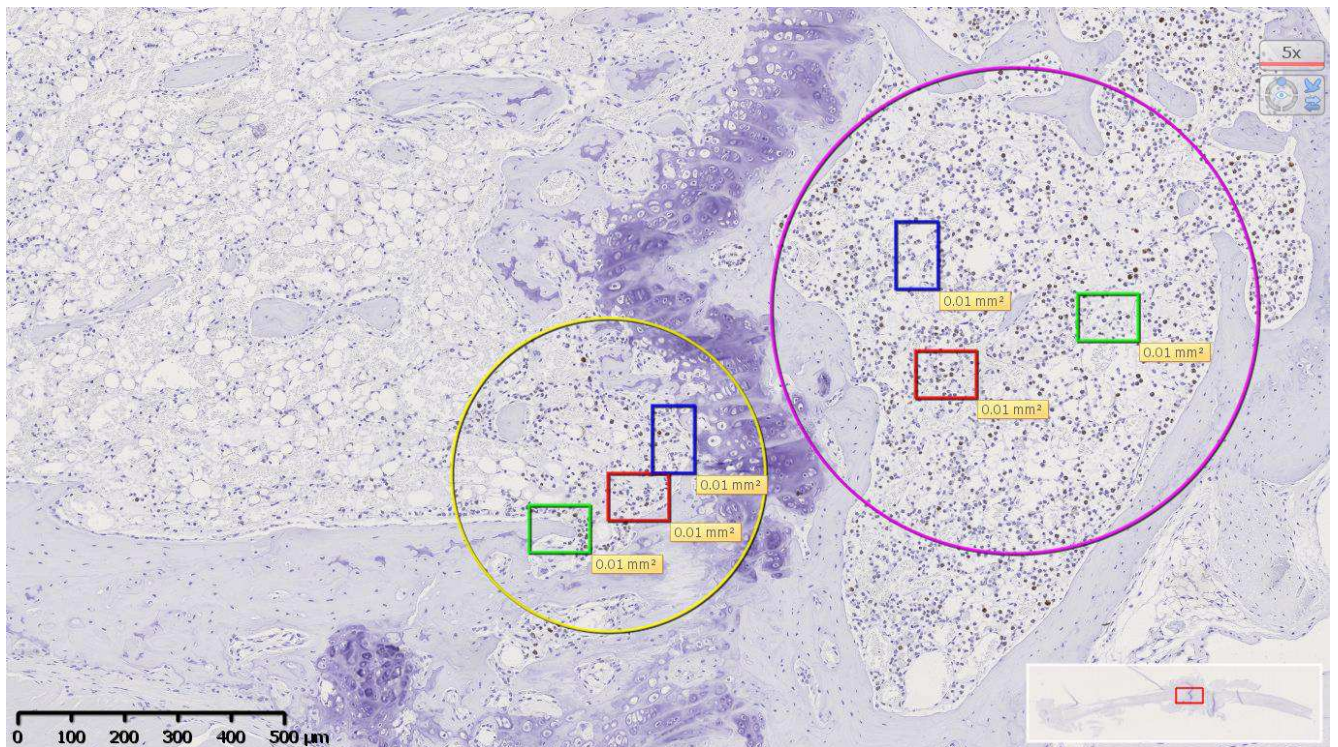
Photo C : grossissement x200 de la même zone d'une coupe sériée. Les cellules humaines, brunes sont révélées grâce à un marquage des séquences ALU. Les cellules murines sont bleues.

### **7.3.4 Analyse immunohistochimique semi-quantitative des cellules humaines résiduelles quiescentes (Ki67).**

#### **7.3.4.1 Aspect d'un fémur de souris leucémique non traitée, à J21**

Le marquage anti-Ki67, montré sur la photo A (x25) de la figure 41, révèle la prolifération des cellules humaines. La comparaison avec le marquage ALU de la figure 37 montre une corrélation parfaite. Le grossissement x200 (photo B) du rectangle vert comparé au même territoire marqué avec une sonde ALU (Photo C x200) confirme ces résultats. La quasi-totalité des blastes humains sont Ki67<sup>+</sup> et sont par conséquent proliférants. Des cellules humaines quiescentes dispersées mais pas regroupées sont identifiables.





**Figure 42 : Coupe sagittale de la TBA distale d'un fémur de NSG traitée au 5-FU, 21 jours post transplantation (marquage Ki67) (x50 ; chimérisme de 5%). Le marquage brun, révèle les cellules exprimant le Ki67. Deux cercles (jaune et rose) entourent des territoires de cellules Ki67<sup>+</sup>.**

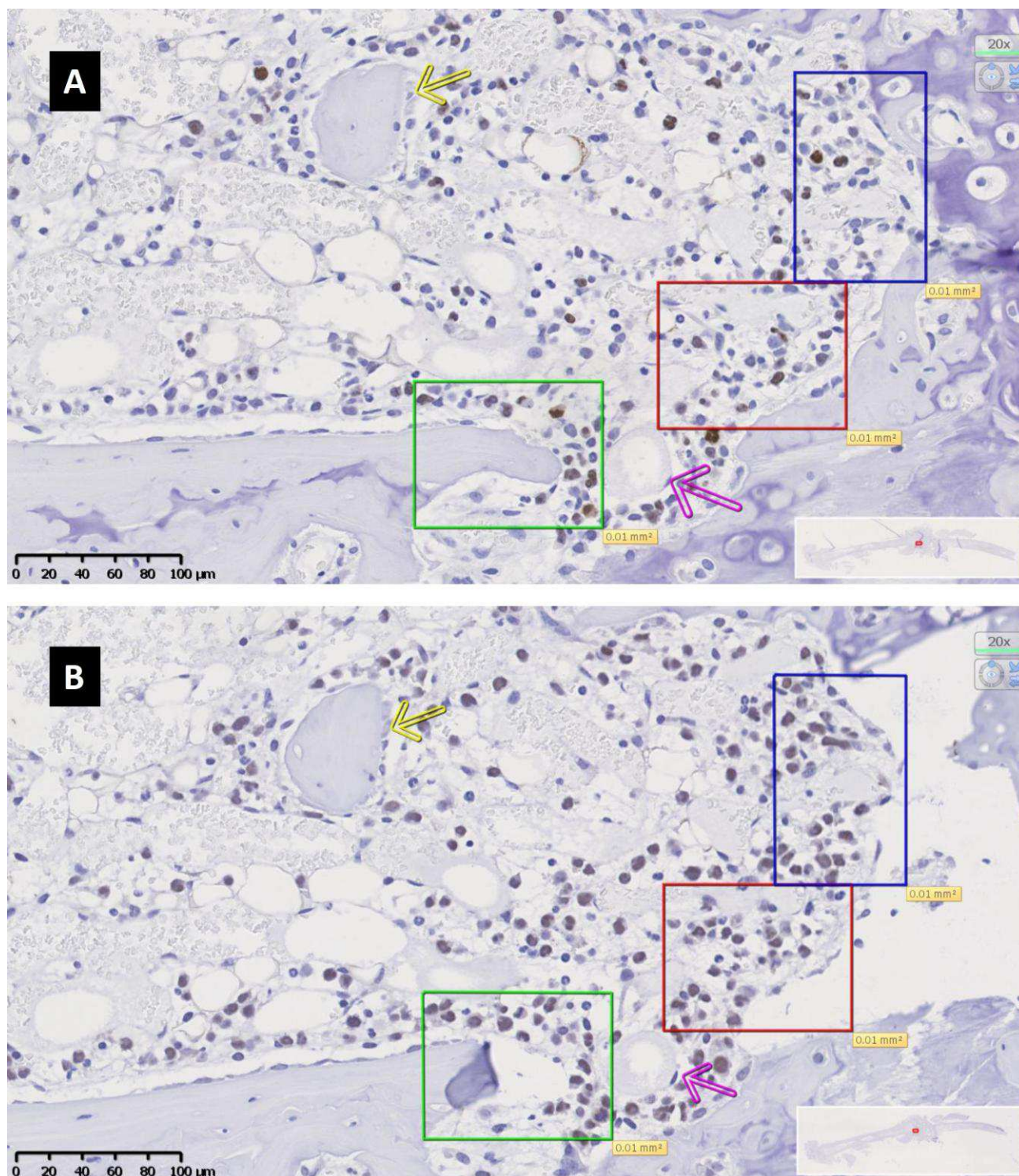
**7.3.4.2 Aspect d'un fémur de souris leucémique traitée au 5-FU, à J21 (anti-Ki67)**

La figure 42 montre au grossissement X50 le résultat d'un marquage anti-Ki67 sur le fémur d'une souris traitée au 5-FU (chimérisme résiduel de 5%). Peu de cellules sont Ki67<sup>+</sup> dans des territoires humains (positifs pour le marquage ALU ; cercles jaune et rose). La majorité des cellules humaines est donc quiescente (Ki67<sup>-</sup>) après traitement par le 5-FU.

La dissémination des cellules Ki67<sup>+</sup> dans les territoires humains semble aléatoire, sans prédominance visible dans des zones particulières

Les deux territoires cerclés ci-dessus sont agrandis dans les figures suivantes.





**Figure 43 : Coupes séries sagittales de la métaphyse distale d'un fémur de NSG trait e au 5-FU, 21 jours post transplantation (marquage Ki67) (x200 ; chimérisme de 5%), proche de l'endoste et de la plaque de croissance. Photo A : le marquage brun révèle les cellules exprimant le Ki67 ; Photo B : marquage des séquences ALU du même territoire. Chaque rectangle de 10 000μm<sup>2</sup> indique par couleur des territoires ou le rapport cellule Ki67<sup>+</sup>/cellules humaines a été étudié. Les flèches de couleurs indiquent deux repères reconnaissables utilisés pour aligner les surfaces  tudi es.**

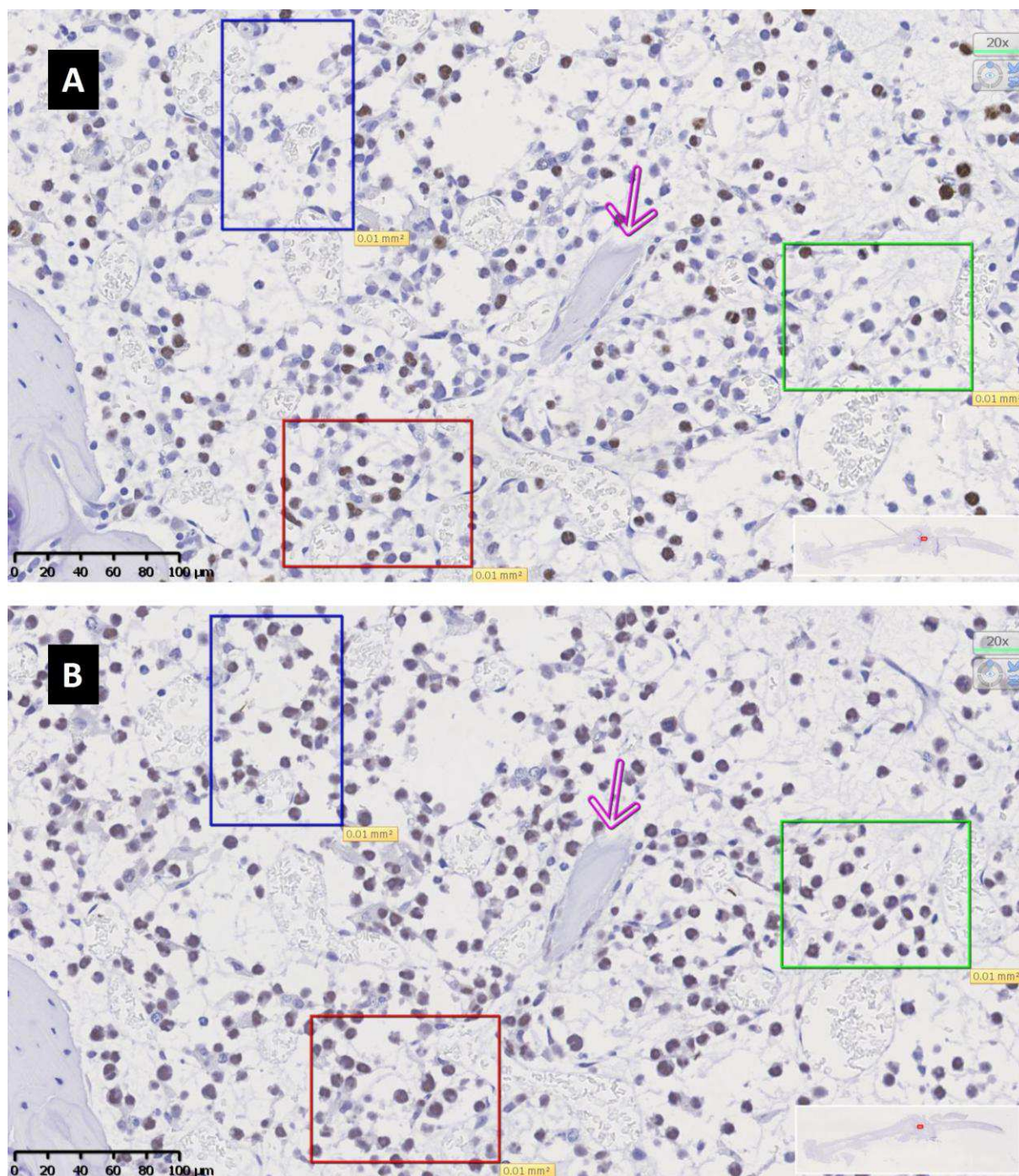
✓ **Analyse d'une région endostéale blastique**

Les photos A (marquage Ki67) et B (marquage ALU) de la figure 43 confirment que la majorité des cellules humaines est quiescente. Le pourcentage de cellules Ki67<sup>+</sup> parmi les blastes humains ALU<sup>+</sup> a été évalué par comptages de ces deux populations dans des rectangles de surface identique (10 000 μm<sup>2</sup>) et apposés le long de l'endoste sur les images de deux coupes sériées fémorales. Les résultats obtenus sont décrits dans le tableau suivant :

	Nombre de cellules totales comptées	Nombre de cellules humaines / totales et %	Nombre de cellules Ki67 <sup>+</sup> / cell humaines et %
Rectangle Bleu	38	29 / 38 = 76%	6 / 29 = 20%
Rectangle rouge	34	28 / 34 = 82%	8 / 28 = 29%
Rectangle vert	31	26 / 31 = 84%	11 / 26 = 42%
	<b>Moyenne (ecart-type) :</b>	81% (+/- 4%)	30% (+/- 11%)

Dans ce territoire endostéal, environ 80% des cellules dans les fenêtres de comptage sont humaines et environ 70% de ces cellules humaines résiduelles après 5-FU sont quiescentes.





**Figure 44 : Coupes séries sagittales de l'épiphyse distale d'un fémur de NSG traitée au 5-FU, 21 jours post transplantation (marquage Ki67) (x200 ; chimérisme de 5%), entre la plaque de croissance et le cartilage articulaire. Photo A : le marquage brun révèle les cellules exprimant le Ki67 ; Photo B : marquage des séquences ALU du même territoire. Chaque rectangle de 10 000 $\mu\text{m}^2$  indique par couleur des territoires où le rapport cellule Ki67<sup>+</sup>/cellules humaines a été étudié. La flèche violette indique un repère reconnaissable et utilisé pour aligner les surfaces étudiées.**

✓ **Analyse d'une région blastique centro-medullaire**

Un autre territoire éloigné de l'endoste a été étudié selon la même méthode (photos A (Ki67) et B (ALU) de la figure 44). Le tableau ci-dessous décrit les résultats obtenus avec les marqueurs Ki67 et ALU:

	Nombre de cellules totales comptées	Nombre de cellules humaines / totales et %	Nombre de cellules Ki67 <sup>+</sup> / cell humaines et %
Rectangle Bleu	37	29 / 37 = 78%	5 / 29 = 17%
Rectangle rouge	46	39 / 46 = 85%	11 / 39 = 28%
Rectangle vert	37	26 / 31 = 84%	8 / 26 = 30%
	<b>Moyenne (ecart-type) :</b>	82% (+/- 4%)	25% (+/- 7%)

Ici, environ 80% des cellules comptées sont humaines, dont 75% sont quiescentes.

Ces résultats ne montrent pas, pour les paramètres étudiés de différences notables entre les deux territoires endostéaux et centromédullaires analysés.

## 7.4 Synthèse des résultats obtenus

Les expériences préliminaires menées en CMF ont montré une résistance au 5-FU d'un dixième des cellules NALM6 xéno greffées malgré la cytopénie induite. Les cellules résiduelles sont majoritairement viables (Annexin V<sup>-</sup>) et quiescentes. La greffe à des receveurs secondaires indique la présence de CIL parmi les cellules résiduelles NALM6.

L'étude histologique met en évidence une migration et une implantation des cellules de la lignée NALM6 transplantées à des souris NSG. Leur prolifération dans diverses régions (épiphyse, métaphyse ou diaphyse) de la moelle osseuse entraîne la formation d'amas de cellules humaines non apoptotiques, majoritairement Ki67<sup>+</sup>, pouvant dépasser 1 mm de diamètre, à J21 post-transplantation. A ce stade, la taille des amas ne permet pas de mettre en évidence un site spécifique d'implantation tel qu'un foyer endostéal.

Nous n'avons pas pu localiser à J21, dans les diverses régions examinées, d'amas contenant une forte densité de cellules humaines Ki67<sup>-</sup> pouvant suggérer la présence de zones hypoxiques. Seules quelques cellules « humaines » Ki67<sup>-</sup> éparses sont observées dans les régions blastiques. Une étude du taux d'oxygénation de ces amas au Pimonidazole reste à faire et semble indispensable pour compléter l'étude.

A J30, l'analyse des fémurs en Trichrome de Masson montre que cette prolifération se poursuit jusqu'à l'envahissement total de la moelle des souris, qui perd sa vascularisation et qui devient grisâtre suggérant une fibrose (qui reste à étudier...).

Nous montrons par un traitement au 5-FU des souris NSG leucémiques, que la cytopénie induite à J21 n'est pas totale et que certains territoires présentent globalement une meilleure résistance à l'effet de la drogue, notamment ceux de la métaphyse et ceux localisés à proximité de la plaque de croissance. Les régions blastiques humaines montrent aussi une résistance plus importante. Peu de cellules apoptotiques sont observables parmi l'ensemble des cellules résiduelles suggérant leur élimination rapide et continue durant le traitement.

Après le traitement, nous n'observons aucune différence incontestable à J21, en termes de densité cellulaire humaine ou de taux de quiescence, entre une région leucémique centromédullaire et une région endostéale. Dans les territoires leucémiques, 70 à 80% des

cellules résiduelles humaines sont quiescentes et disséminées. Aucun foyer de cellules quiescentes n'est observé dans les zones ostéoblastiques supposées hypoxiques.

La cytopénie médullaire qui suit le traitement, est corrélée à une suffusion hémorragique et à une « réapparition » de lumières vasculaires ; ce qui amène la question de la nouvelle répartition du taux d'oxygène dans les diverses régions de la moelle osseuse.



## **8 Cellules primaires : une partie des cellules leucémiques de patients résiste *in vivo* à 3 injections de 5-FU**

Ces expériences sont encore en cours. Durant l'expérimentation, une surmortalité de la colonie NSG de l'animalerie est apparue (médiane de vie à 6 mois) qui pourrait être due à la découverte de manière concomitante d'une contamination par *Helicobacter hepaticus*. De plus, nous avons noté, dans la même période et pour d'autres expérimentations du groupe, une altération de la prise de greffe des cellules souches hématopoïétiques normales.

Bien qu'aucune publication ne fasse état d'interactions entre cette infection bactérienne chronique et le tissu hématopoïétique, un biais expérimental est probable.

Les résultats présentés dans ce chapitre sont donc préliminaires et devront être confirmés avec d'autres échantillons et des animaux exempts d'infection.

## 8.1 Matériel et méthodes

### 8.1.1 Echantillons de patients :

Les différents échantillons de cellules primaires ont été récupérés grâce au Dr E. Lippert, auprès du Centre de Ressources Biologiques (CRB – Tumorothèque) du CHU de Bordeaux avec l'autorisation de leur conseil scientifique (filière « Hémopathies malignes »).

A ce jour, trois échantillons de cellules mononucléées décongelés prélevés sur trois enfants atteints de LAL au diagnostic ont été étudiés (Tableau 13) :

Nom du patient	N° du Patient	Sexe	Age lors du prélèvement	Type d'anomalie cytogénétique	Nature du prélèvement
Phi+1	MC0903	Masculin	10 ans	t(9 ; 22) Chromosome de Philadelphie	Moelle
HDip1	LA1110	Masculin	18 mois	Hyperdiploïdie	Sang
TEL1	CD1106	Masculin	6 ans	t(12 ; 21) TEL/AML1	Moelle

**Tableau 13 : Caractéristiques des échantillons étudiés.**

Les cellules ont été décongelées et incubées à  $10^6$  cellules/mL dans du milieu HP01 (MacoPharma) complémenté extemporanément avec des cytokines humaines (10ng/mL d'IL3, 10ng/mL d'IL7 et 100ng/mL de SCF), la veille de la xéno-transplantation, afin de permettre la récupération cellulaire et un comptage fiable des cellules vivantes avant l'injection.

### 8.1.2 Transplantation et suivi des souris xéno greffées

Les souris NSG (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ ; Jackson Laboratory ; #005755) âgées de 8 à 10 semaines, sont conditionnées par injection intrapéritonéale (à J-2 et J-1) de Busulfan (Busilvex ; 20mg/kg/injection). A J0, 250 000 cellules primaires vivantes sont

transplantées par souris (groupes de 3 à 8 souris / échantillon de LAL) par injection intra-fémorale (figure 45).

La prise de greffe et le phénotype des cellules sont suivis en analysant par CMF (Cytomètre Fortessa ; Becton, Dickinson and Co) de la moelle de souris prélevée tous les 15 jours environ, dans le fémur injecté à J0.

**Le fémur ayant subi la transplantation ou/et le prélèvement sera nommé « injecté » par opposition à l'autre fémur appelé « controlatéral » qui n'est utilisé qu'après le sacrifice.**

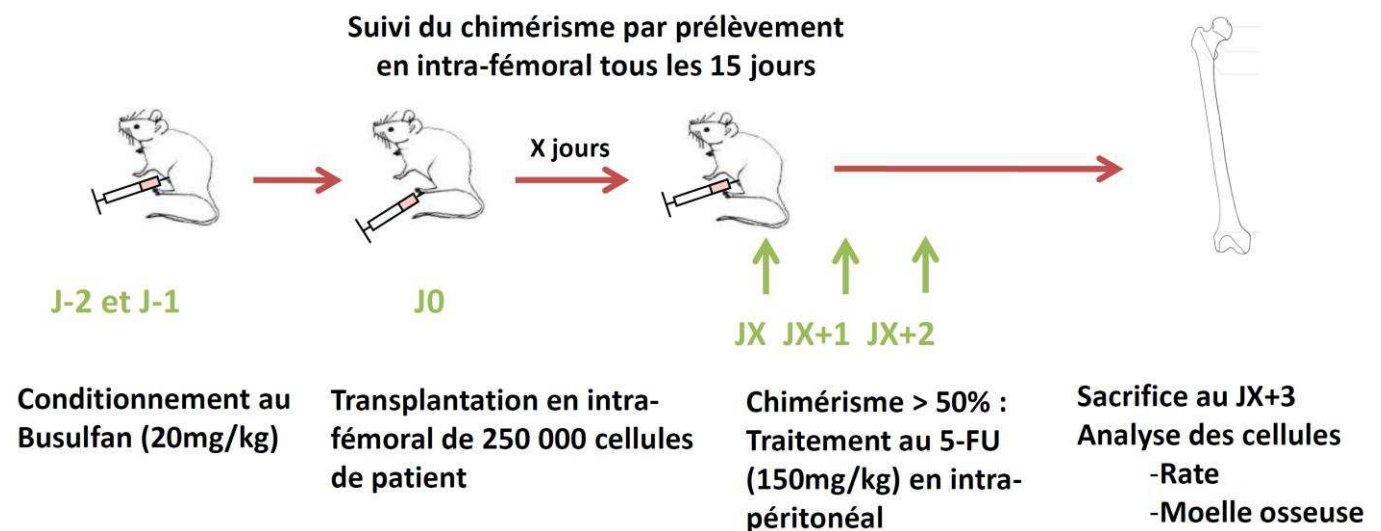


Figure 45 : Protocole de transplantation et de suivi des cellules leucémiques xénogreffées



### **8.1.3 Sacrifice des animaux et analyse des tissus**

Lorsque le chimérisme humain dépasse 50%, les animaux sont :

- ✓ soit sacrifiés : animaux leucémiques contrôles
- ✓ soit traités au 5-FU (5-FluoroUracile Dakota, solution à 50 mg/mL) par 3 injections intrapéritonéales (150mg/kg/24 heures ; solution à 5mg/mL). Les souris sont sacrifiées 12 heures après la troisième injection.

Les fémurs, 3 à 4 vertèbres lombaires, 3 à 4 vertèbres caudales et les rates des animaux contrôles et traités sont prélevés. Les vertèbres ainsi que la moitié des rates sont fixées avec une solution de PBS 3,7% formaldéhyde (au minimum 20 volumes de solution par volume d'organe) et sont destinées à une étude histologique. L'autre moitié des rates, la moelle des fémurs controlatéraux sont destinées à des études de cycle cellulaire ou à des transplantations secondaires.

### **8.1.4 Identification phénotypique des cellules humaines xéno greffées :**

Les cellules prélevées sont lavées une fois au PBS (300g ; 5 minutes ; 20°C). Le culot cellulaire est remis en suspension et incubé 30 minutes à 4°C dans 25µL d'une solution de PBS contenant six anticorps monoclonaux commerciaux dilués au 1/50 (tableau X). Après centrifugation, les cellules sont remises en suspension 15 minutes à température ambiante dans une solution de lyse des hématies (BD Pharm Lyse ; #555899). Après deux lavages et resuspension en PBS, les cellules sont analysées en CMF.

Le chimérisme humain est mesuré avec deux marqueurs humains et un murin : l'antigène HLA-DR, le cluster de différenciation humain CD45 et le cluster de différenciation murin CD45. La greffe des cellules B leucémiques est mesurée par un double marquage des antigènes humains CD19 et CD10. Ce dernier est aussi appelé CALLA pour « Common Acute Lymphocytic Leukemia Antigen ». Les cellules leucémiques « primitives » sont recherchées par la détection de l'antigène CD34<sup>+</sup> (tableau 14).

Cellules cibles	Anticorps utilisés	Fluorochromes couplés	Fournisseurs	Réf.	Clones
Hématopoïétiques humaines	Anti-HLA-DR	BV711	BioLegend	307643	L243
	Anti-hCD45	FITC	Beckman-Coulter	A07782	J33
Hématopoïétiques murines	Anti-mCD45	APC/Cy7	BioLegend	103116	30-F11
Précurseurs B	Anti-CD10	APC	Beckman Coulter	IM3633	ALB1
	Anti-CD19	PE	BD Pharmingen	555413	HIB19
Hématopoïétiques primitives	Anti-CD34	Pacific Blue	BioLegend	343512	581

Tableau 14 : Anticorps utilisés pour identifier et compter les cellules humaines leucémiques

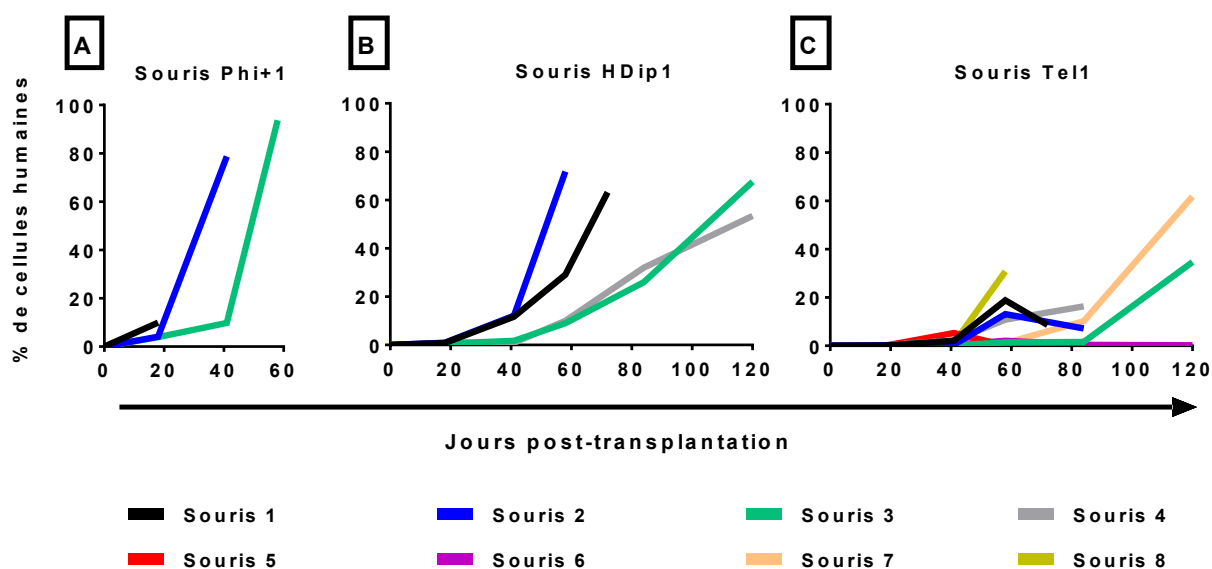
### 8.1.5 Analyse en CMF des cellules humaines résiduelles quiescentes (Ki67)

250 000 cellules humaines médullaires et spléniques sont lavées une fois au PBS (300g ; 5 minutes ; 20°C). Le culot cellulaire est remis en suspension et incubé 30 minutes à 4°C dans 25µL d'une solution de PBS contenant l'anticorps Anti-HLA-DR. Après centrifugation (300g ; 5 min ; 20°C) les cellules sont remises en suspension et incubées à l'obscurité (45 min ; 4°C) dans 100µL d'une solution de fixation et perméabilisation extemporanée (H<sub>2</sub>O, 0,05% (m/v) Saponine, 0,4% (m/v) PFA, 10 mM HEPES). Après un double lavage (300g ; 5 min ; 20°C) en PBS additionné de 5% (v/v) de SVF, 2 mM d'EDTA, les cellules sont resuspendues et incubées (30 min ; 4°C) avec 10µL d'anticorps anti-Ki67-PE (BD Pharmingen ; #556026). Après lavage en PBS, les cellules sont reprises dans 250µL d'une solution de PBS additionnée de 1µM TO-PRO®-3 Iodide (Life Technologies ; #T3605) et analysées en CMF.

## 8.2 Résultats

### 8.2.1 Etude du chimérisme leucémique après xéngreffe

#### 8.2.1.1 Quantification du chimérisme



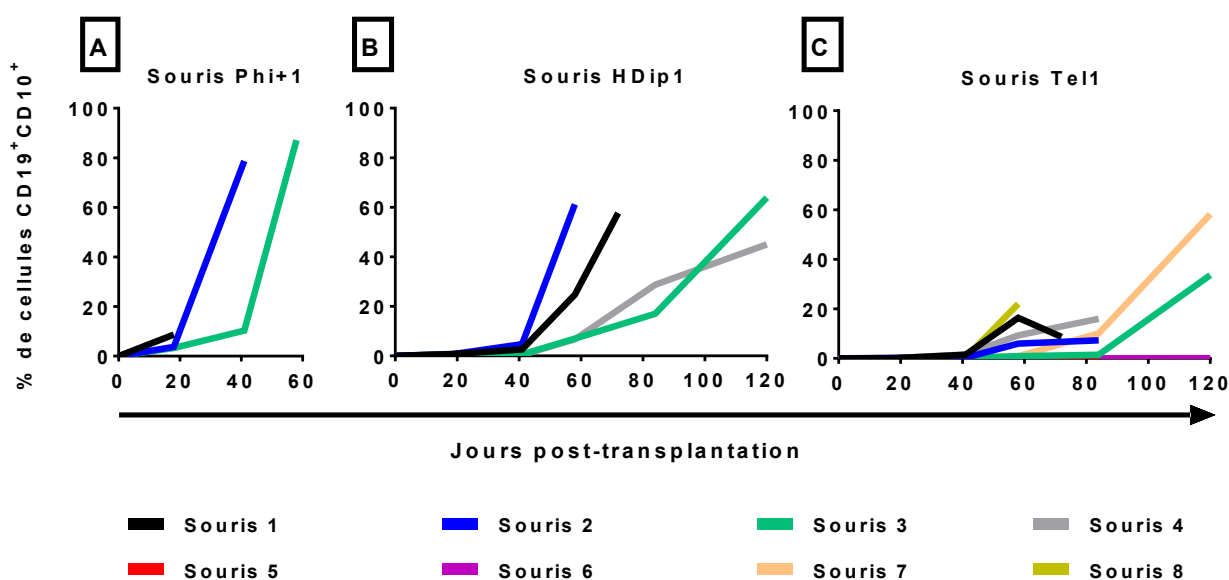
**Figure 46 : Evolution du chimérisme des cellules humaines transplantées** : la prise de greffe humaine des échantillons leucémiques Phi+1 (A), HDip1 (B) et Tel1 (C) est suivie en CMF grâce aux marqueurs HLA-DR<sup>+</sup> et CD45<sup>+</sup>) par prélèvement intrafémoral des souris transplantées.

La figure 46 montre une prise de greffe hétérogène selon les échantillons de LAL :

- LAL Phi+1 : une des trois souris transplantées est morte à J15. Les deux survivantes ont une cinétique de greffe comparable et atteignent 50% de chimérisme avant le 50<sup>ème</sup> jour post transplantation.
- LAL HDip1 : 4 souris transplantées. La prise de greffe est plus lente et les cinétiques de xéngreffe plus hétérogènes chez les 4 souris.
  - A J50, le chimérisme va de moins de 10% (2 souris) à plus de 50% (une souris)
  - A J80, deux souris ont toujours moins de 40% de cellules leucémiques.

- LAL TEL1: 8 souris transplantées. Au total, il y a eu greffe de 6 souris sur 8. Aucun chimérisme supérieur à 1% de cellules humaines n'a été détecté dans les souris 5 et 6. La prise de greffe est ici moins évidente. A J60, 4 souris présentent un chimérisme entre 10 et 35% (souris 1, 2, 4 et 8), mais 4 n'ont pas de cellules humaines détectables (>1%) dans le fémur injecté. A J120, la souris 6 n'est toujours pas chimérique et les souris 3 et 7 ont plus de 35% de chimérisme. Trois souris (n°2, 4 et 5) sont mortes entre J80 et J120. Cette mortalité ne semble pas être due à la leucémie mais probablement à un problème d'infection par *Helicobacter Hepaticus*.

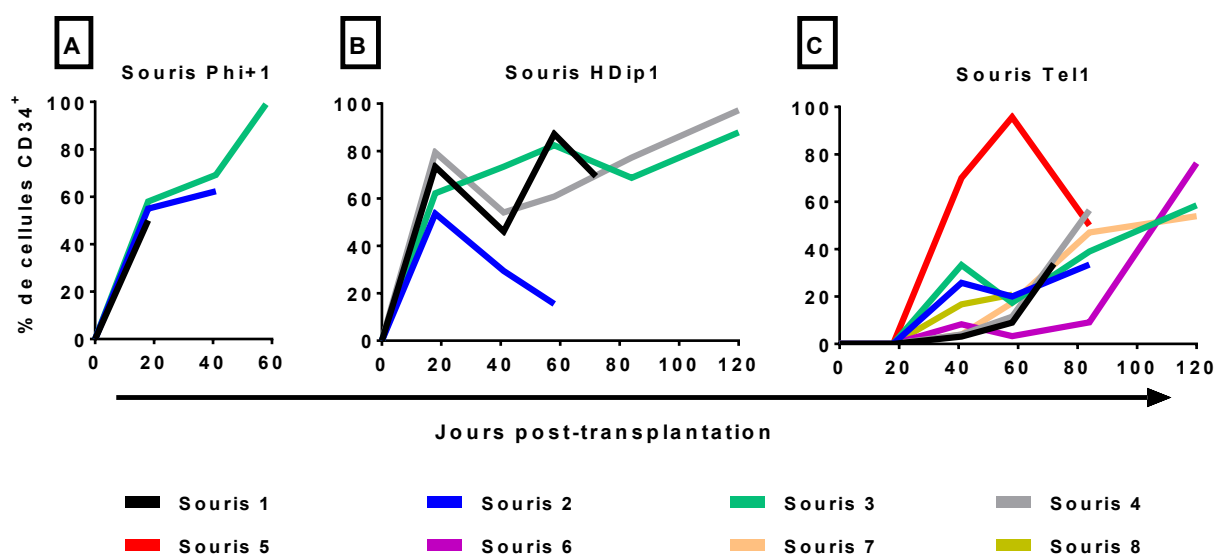
### 8.2.1.2 Evolution du chimérisme leucémique



**Figure 47 : Cinétique d'envahissement médullaire leucémique par les cellules humaines transplantées** : la xénogreffe leucémique (cellules HLA-DR<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>) des échantillons Phi+1 (A), HDip1 (B) et Tel1 (C) est suivie en CMF par prélèvement intrafémoral des souris transplantées.

L'évolution du chimérisme des cellules leucémiques humaines B (triple marquées HLA-DR<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>) est presque similaire à celle obtenue figure 47 montrant que la xénogreffe est exclusivement leucémique.

### 8.2.1.3 Expression du CD34 par les cellules xéngreffées



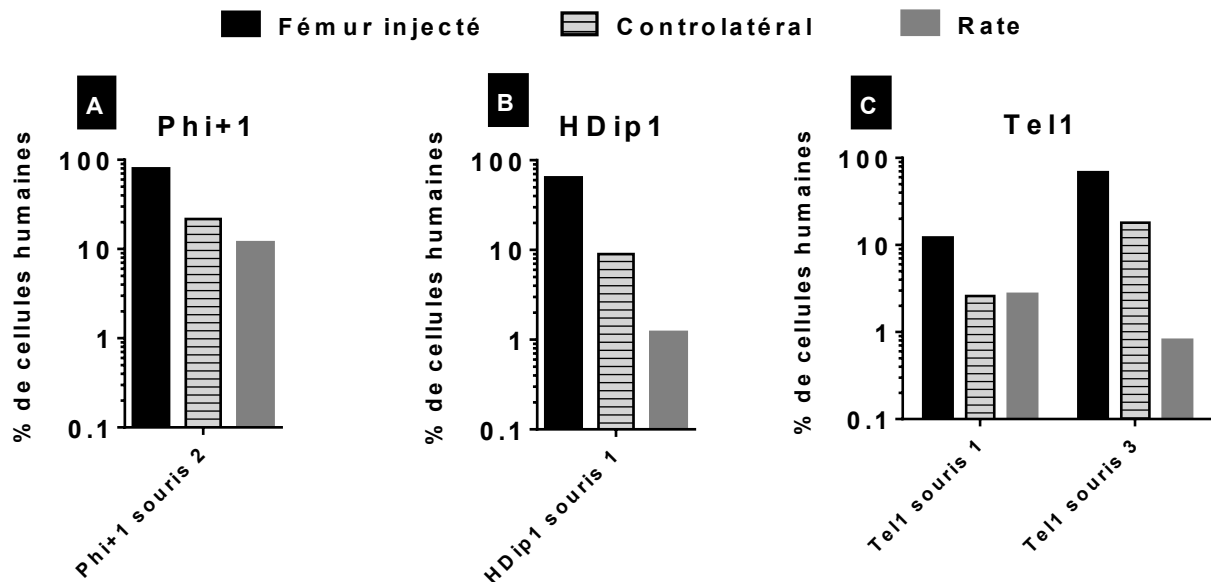
**Figure 48 : Evolution du chimérisme des cellules  $CD34^+$  dans la population humaine ( $HLA-DR^+CD45^+$ ) transplantée : le pourcentage des cellules  $CD34^+$  est suivi en CMF par prélèvement intrafémoral des souris transplantées avec les échantillons leucémiques Phi+1 (A), HDip1 (B) et Tel1 (C).**

Le pourcentage de cellules  $CD34^+$  au sein de la population humaine greffée varie selon les échantillons et pour un même échantillon en fonction du jour post transplantation (figure 48). Enfin, le pourcentage de cellules  $CD34^+$  dans la population humaine croît en fonction du temps chez toutes les souris greffées.

### 8.2.1.4 Chimérisme leucémique au sacrifice dans les tissus analysés

Au sacrifice des animaux (>50% de cellules humaines dans la moelle du fémur injecté), le chimérisme des fémurs controlatéraux et des rates a été analysé avec un double objectif :

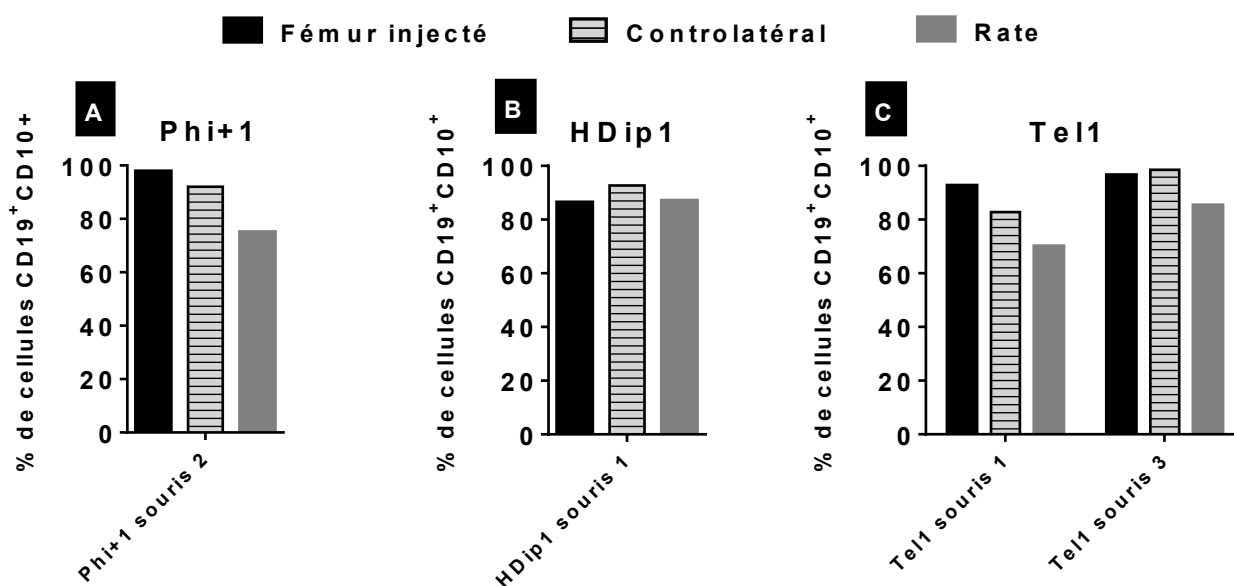
- Evaluer la dissémination sanguine des cellules leucémiques dans les autres territoires hématopoïétiques : moelle des os non injectés (fémur controlatéral) et rate.
- Savoir si leur phénotype est le même dans ces divers territoires.



**Figure 49 : Comparaison du chimérisme humain dans le fémur injecté, le fémur controlatéral et la rate des souris au sacrifice :** la présence de cellules humaines double positives ( $HLA-DR^+CD45^+$ ) issues des échantillons Phi+1 (A), HDip1 (B) et Tel1 (C) est analysée en CMF.

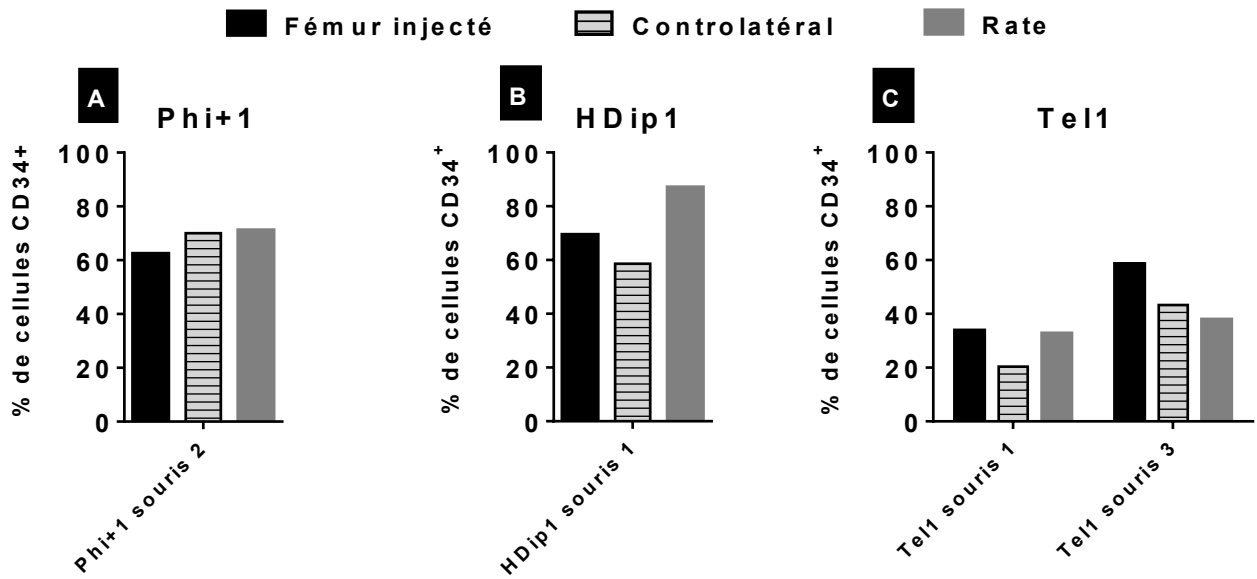
Des cellules humaines  $HLA-DR^+CD45^+$  sont retrouvées dans tous les sites étudiés démontrant que les cellules injectées en intrafémoral sont capables de se développer, ainsi que de migrer et de se nicher dans tous les territoires hématopoïétiques (figure 49). Toutefois, le développement des cellules leucémiques y est retardé et/ou ralenti. Ce résultat suggère que la migration et/ou la nidation des cellules leucémiques (toutes ou les CIL) à partir du fémur injecté est secondaire à leur développement dans le site initial, et que

la transplantation intrafémorale améliore la prise de greffe en réduisant/éliminant les problèmes d'adressage et en facilitant la prolifération des cellules leucémiques.



**Figure 50 : Envahissement leucémique médullaire et splénique au sacrifice : pourcentage des cellules CD19<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup> dans la population humaine (HLA-DR<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>) du fémur injecté, du fémur controlatéral et de la rate des souris transplantées avec les échantillons Phi+1 (A), HDip1 (B) et Tel1 (C).**

Les cellules CD19<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup> représentent plus de 80% des cellules humaines (HLA-DR<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>) dans tous les territoires analysés indépendamment de l'échantillon transplanté (figure 50). Ceci confirme que la population greffée est leucémique, totalement ou presque.



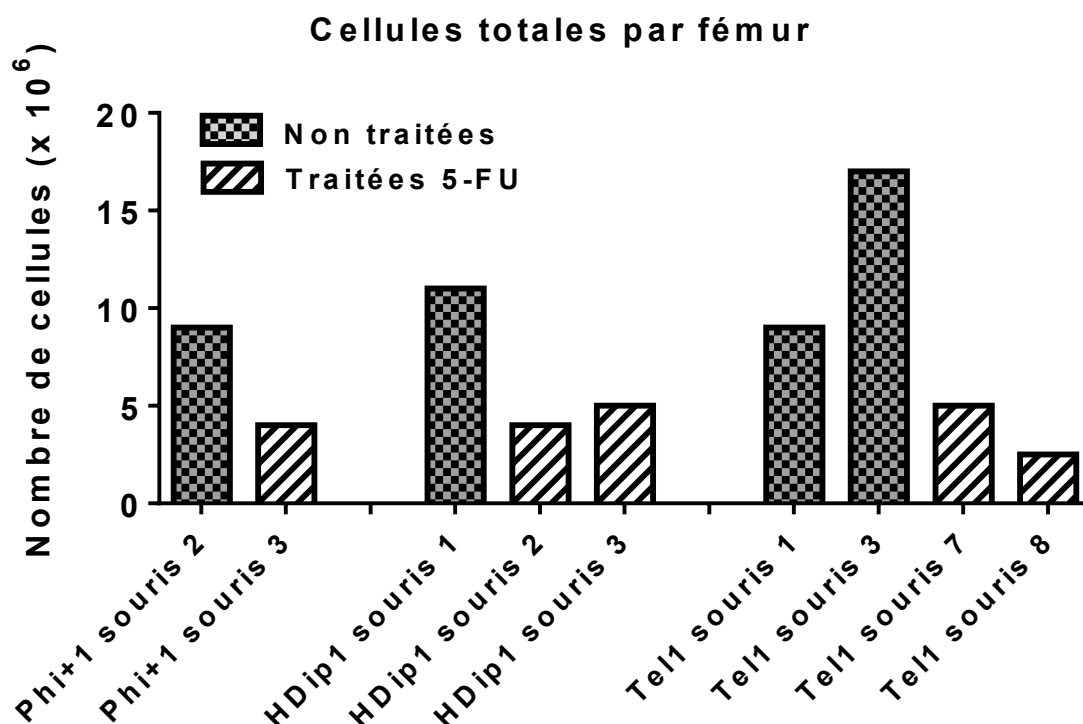
**Figure 51 : Pourcentage de cellules « primitives » dans la population humaine (HLA-DR<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>) médullaire et splénique au sacrifice : les cellules CD34<sup>+</sup> dans la population humaine (HLA-DR<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>) des échantillons Phi+1 (A), HDip1 (B) et Tel1 (C) ont été identifiées dans le fémur injecté, le fémur controlatéral et la rate des souris transplantées.**

L'expression du CD34 dans la population humaine ne varie pas entre les territoires étudiés (figure 51). Ces résultats suggèrent que la population qui migre et se développe dans les autres territoires hématopoïétiques est la même que celle qui s'est implantée et a proliféré au site de greffe fémoral initial. Contrairement à l'expression des marqueurs CD19 et CD10 présents sur la quasi-totalité des cellules, le CD34 n'est présent que sur une partie des cellules. Ce point sera revu plus loin.



## 8.2.2 Effet du 5-FU sur la persistance des cellules leucémiques xénogreffées

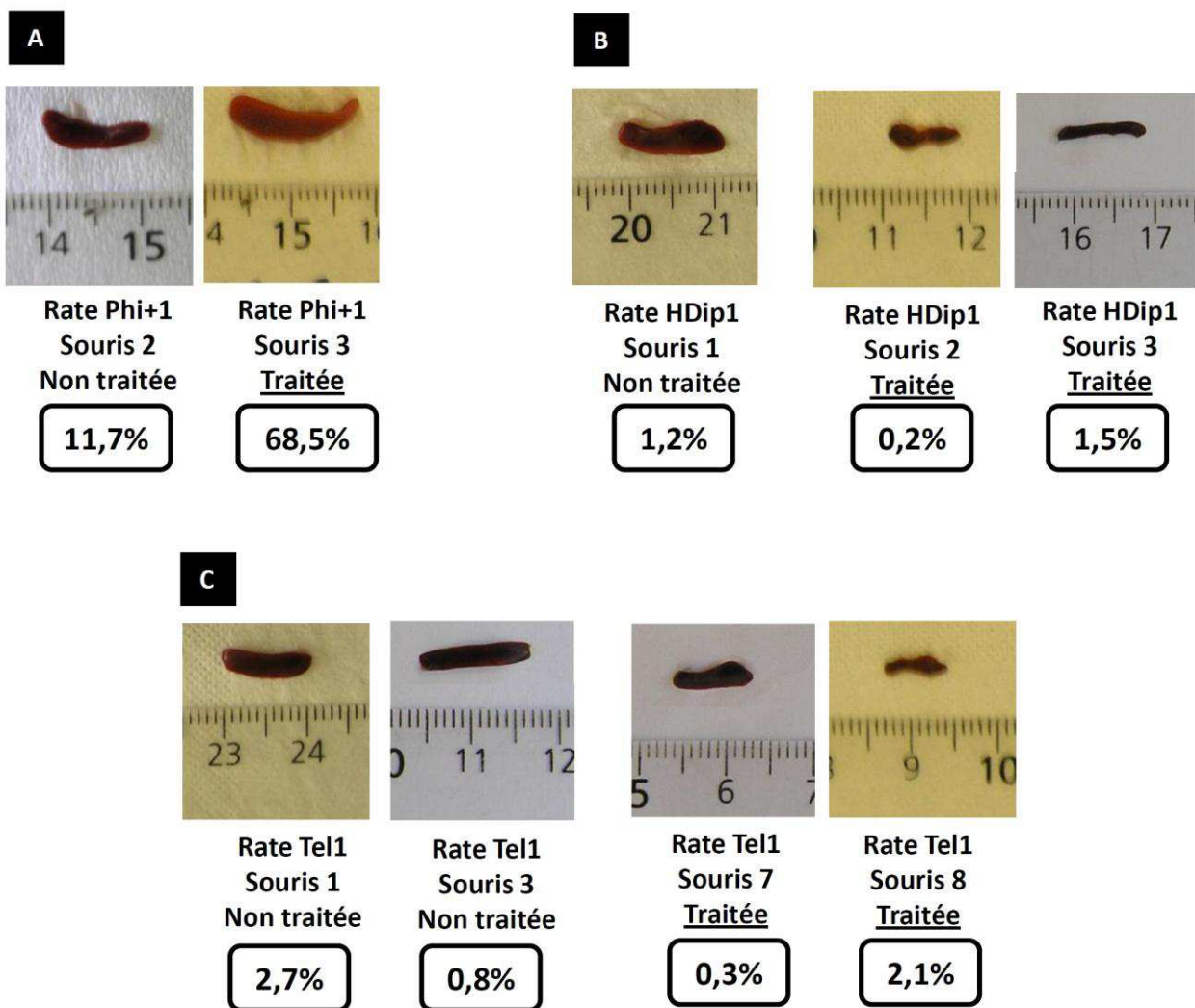
### 8.2.2.1 Effet du 5-FU sur la cellularité médullaire



**Figure 52 : Le 5-FU diminue le nombre de cellules médullaires.** Le comptage des cellules humaines et murines a été réalisé dans le fémur controlatéral d'animaux traités ou non au 5-FU en cellule de Malassez après lyse érythrocytaire.

Le 5-FU induit une diminution de deux tiers du nombre total des cellules médullaires du fémur controlatéral de toutes les souris analysées (figure 52).

### 8.2.2.2 Effet du 5-FU sur la taille splénique



**Figure 53 : Taille et chimérisme leucémique des rates de souris xéno greffées au sacrifice :** L'échelle centimétrique permet la comparaison des rates de souris infiltrées par les cellules Phi1+ (A), HDip1 (B), Tel1 (C) et traitées ou non par le 5-FU avant le sacrifice. En encadré : les pourcentages de cellules humaines (HLA-DR<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>/ cellules totales) des divers échantillons au sacrifice.

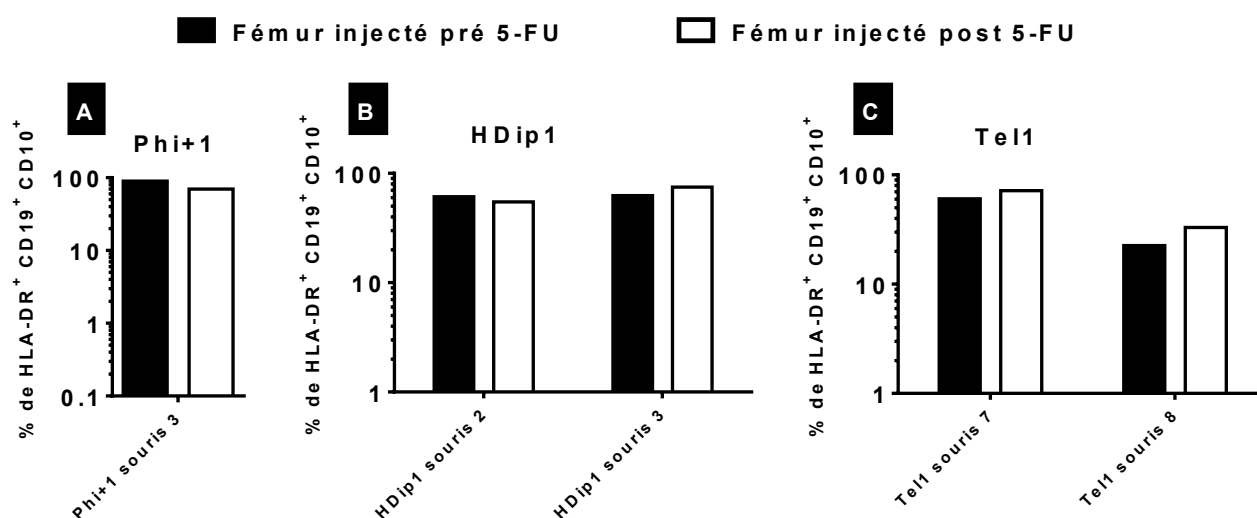
Chez les animaux non traités, les résultats sont très différents de ceux observés avec la lignée NALM6 puisque le chimérisme splénique reste faible (<12%) (figure 53). Aucune splénomégalie n'est mise en évidence chez les souris leucémiques (envahissement médullaire certain).

Les rates des quatre souris traitées par le 5-FU (n°2 et 3 HDip1 et n°7 et 8 Tel1) ont une taille inférieure à celle d'une rate de souris non transplantée (cf figure 32B ; similaire à celle de la souris n°1 HDip1). Ceci est probablement lié (comme sur les cellules médullaires

murines) à l'action du 5-FU sur les cellules hématopoïétiques spléniques murines normales majoritaires.

La souris traitée n°3 Phi+1 présente une splénomégalie. Lors des expérimentations avec la NALM6, aucune splénomégalie n'avait été mise en évidence chez des souris traitées au 5-FU.

### 8.2.2.3 Effet du 5-FU sur le pourcentage de cellules humaines leucémiques



**Figure 54 : Variation de la population leucémique médullaire induite par le 5-FU : les cellules provenant des échantillons Phi+1 (A), HDip1 (B) et Tel1 (C) présentes dans les fémurs injectés ont été identifiées ( HLA-DR<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>) par CMF avant et après traitement par le 5-FU.**

Le pourcentage de cellules humaines lymphoblastiques et de cellules primitives varie peu suite au traitement par le 5-FU (figure 54). Le 5-FU agit donc, pour cet organe, de manière similaire sur les cellules humaines et murines.

### 8.2.2.4 Effet du 5-FU sur la population CD34<sup>+</sup> humaine

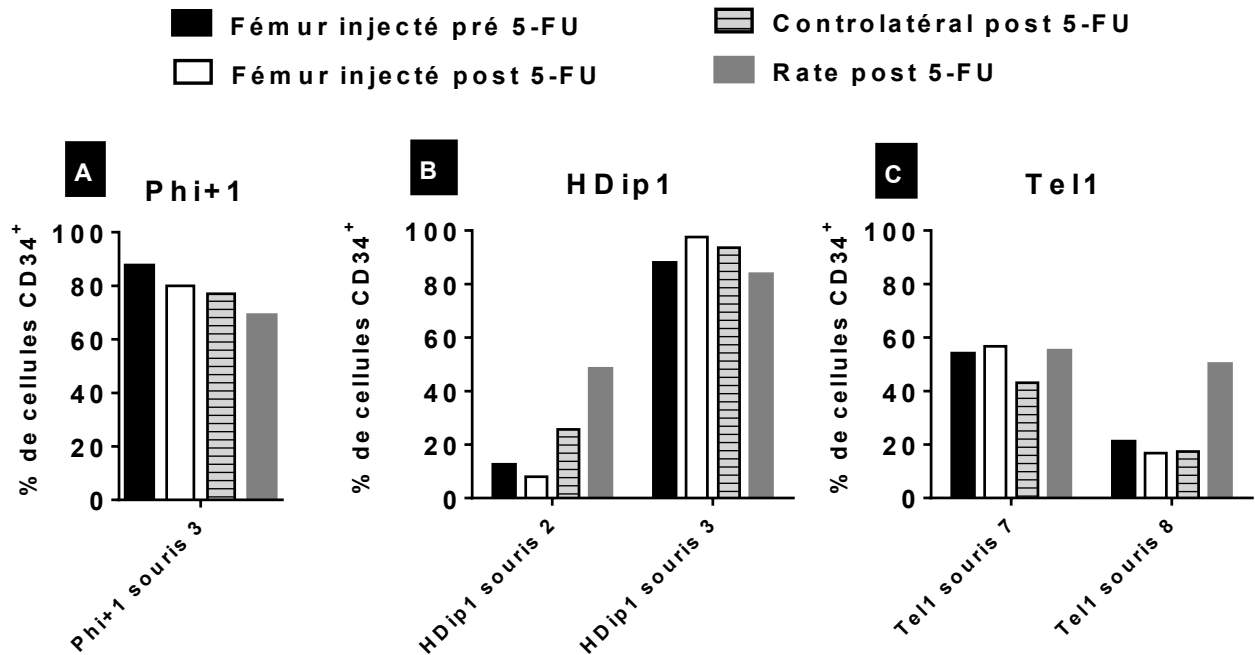


Figure 55 : Pourcentage, par échantillon testé Phi+1 (A), HDip1 (B) et Tel1 (C), de cellules « primitives » (CD34<sup>+</sup>) dans la population humaine (HLA-DR<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>) dans les fémurs injectés avant et après traitement des souris au 5-FU, dans les fémurs controlatéraux et dans les rates après traitement des souris.

- fémur injecté :

Quelles que soient les souris, le traitement au 5-FU ne modifie pas le pourcentage de cellules humaines leucémiques CD34<sup>+</sup>. Il agit donc de manière équivalente sur les différentes sous population indépendamment de leur phénotype (figure 55).

- fémur controlatéral et rate :

Les pourcentages de cellules CD34<sup>+</sup> dans le fémur controlatéral et la rate sont très similaires à ceux du fémur injecté (figure 55). Ces résultats ainsi que ceux de la figure 54, suggèrent que les populations leucémiques de ces territoires diffèrent peu, en particulier pour le cycle cellulaire et que l'agression mécanique fémorale répétée n'a pas ou peu d'effet sur les paramètres testés ici.

### 8.2.2.5 Effet comparatif du 5-FU sur les populations leucémiques CD34<sup>+</sup> et CD34<sup>-</sup>

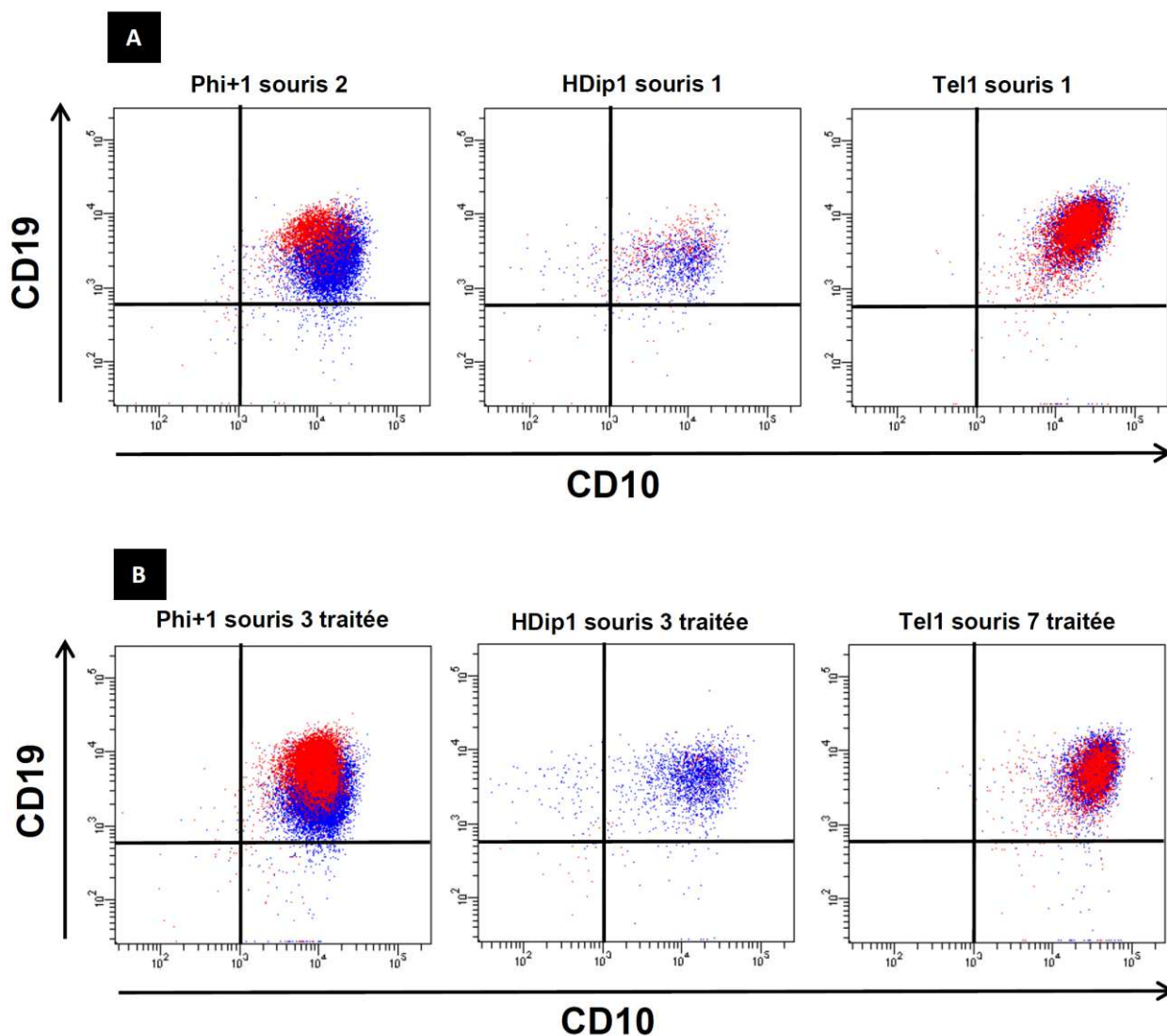


Figure 56 : Expression des marqueurs CD19 et CD10 par les cellules HLA-DR<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> et HLA-DR<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup> médullaires : les points bleus représentent les cellules CD34<sup>+</sup> et les points rouges les CD34<sup>-</sup> des souris non traitées (A) ou traitées (B) au 5-FU des trois échantillons testés.

La quasi totalité des cellules co-expriment le CD19 et le CD10 (figure 56). Il est impossible d'identifier de différence significative de leur expression entre les cellules humaines CD34<sup>+</sup> et CD34<sup>-</sup>, tant avant qu'après traitement par le 5-FU. Nous n'observons pas non plus clairement de population exprimant seulement l'un ou l'autre de ces trois marqueurs.

### 8.2.3 Etude de la quiescence des cellules leucémiques résiduelles après traitement des animaux au 5-FU

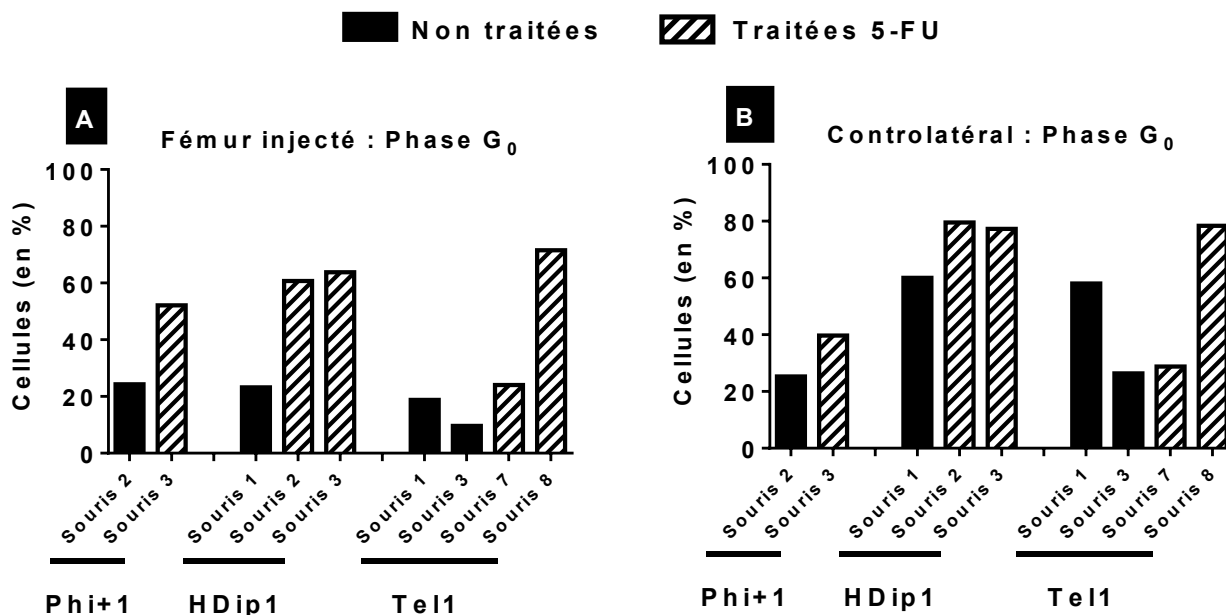


Figure 57 : Pourcentage de cellules quiescentes (G<sub>0</sub> : Ki67<sup>-</sup>) dans la population humaine (HLA-DR<sup>+</sup>) dans les fémurs injectés (A) ou controlatéraux (B) de souris traitées ou non traitées au 5-FU.

- Population cellulaire des fémurs injectés (figure 57A) :

Environ 80% des cellules humaines présentes dans la moelle, sont dans les phases actives du cycle (Ki67<sup>+</sup>) et 20% en moyenne sont quiescentes en G<sub>0</sub> (2n et Ki67<sup>-</sup>) quel que soit l'échantillon transplanté.

Le traitement au 5-FU entraîne pour tous les greffons testés une augmentation importante du pourcentage de cellules humaines quiescentes suggérant une meilleure résistance de ces cellules.

- Population cellulaire des fémurs controlatéraux (figure 57B) :

Dans ces territoires médullaires qui n'ont subi aucune invasion mécanique le pourcentage de cellules leucémiques quiescentes avant traitement est plus important, suggérant que la localisation des cellules leucémiques dans un environnement médullaire intact ou perturbé joue un rôle dans la régulation de la quiescence et/ou de l'entrée en cycle de ces cellules.

Cependant, le traitement par le 5-FU induit ici aussi une augmentation du % de cellules en G0.

Les résultats concernant les phases du cycle cellulaire G<sub>1</sub> et S/G<sub>2</sub>M ainsi que l'état de cycle des cellules humaines spléniques, n'apportent pas d'éléments majeurs. Ils ne seront pas développés ici.

### 8.2.4 Résultats des greffes secondaires et tertiaires

Les résultats obtenus à ce jour, l'ont été uniquement pour les cellules Phi+1. Les greffes secondaires de cellules provenant des deux autres patients ont aussi été faites et leurs résultats sont en attente.

#### 8.2.4.1 Evolution du chimérisme après greffe secondaire

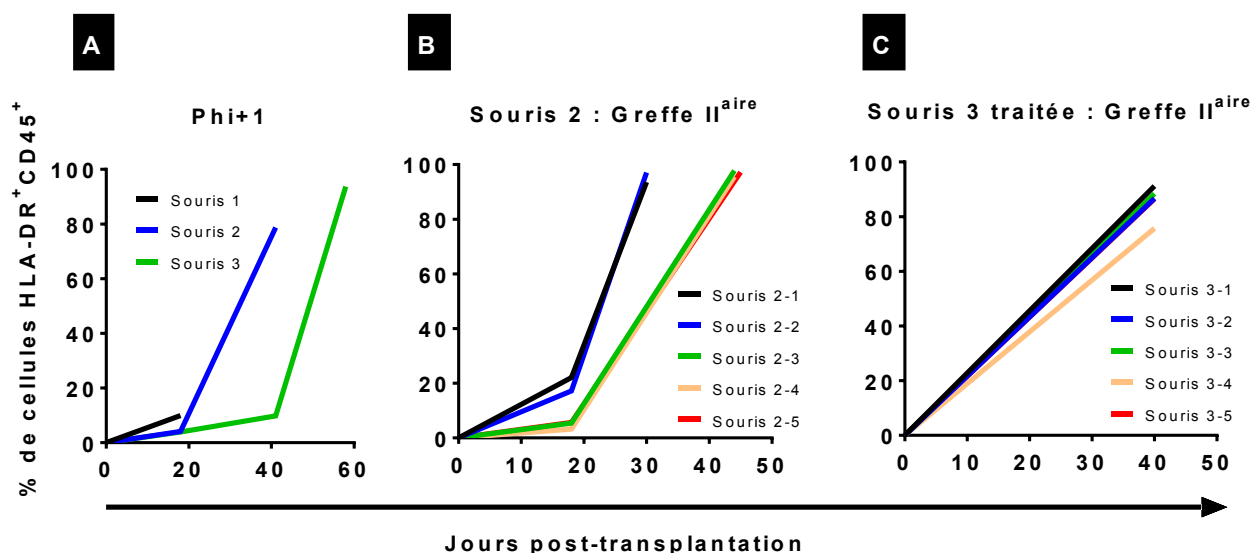
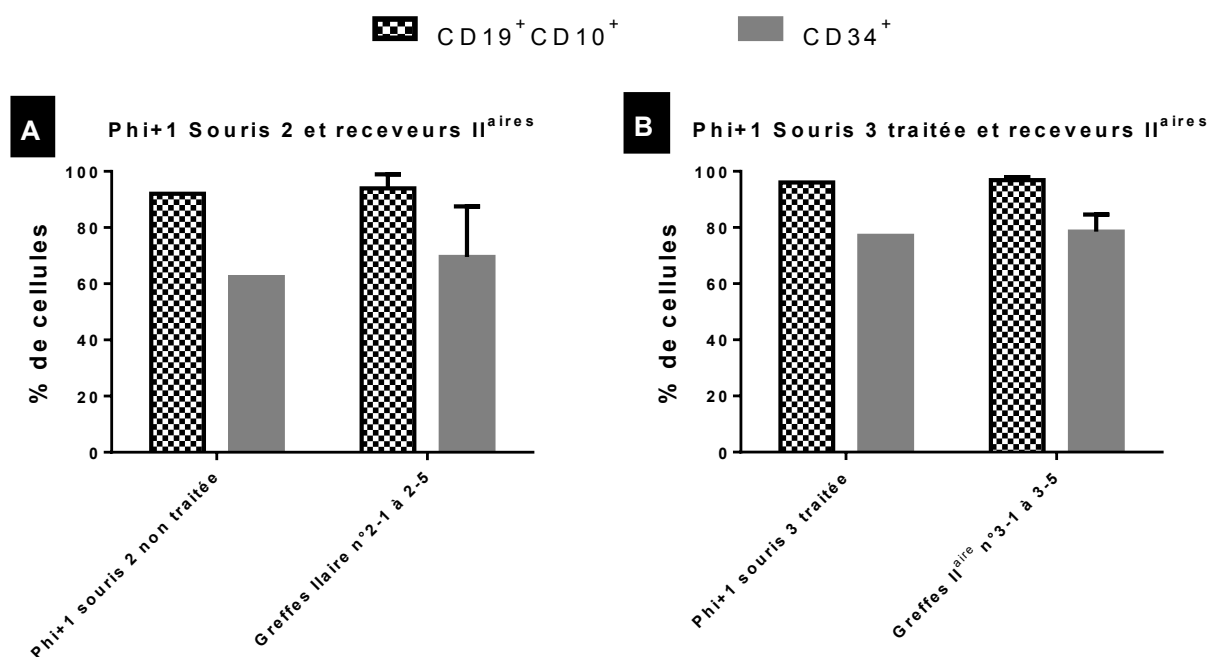


Figure 58 : Cinétique de xénogreffe humaine (HLA-DR<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup>) des souris transplantées avec l'échantillon Phi+1. Le graphe A représente la greffe primaire ; le B, la greffe secondaire obtenue par transplantation de cellules de la souris non traitée 2 Phi+1 ; le C, la greffe secondaire obtenue à partir de la souris traitée 3 Phi+1 (aucun prélèvement intermédiaire).

Les 5 souris 2-x et 3-x ont été transplantées avec 1/10 de fémur controlatéral correspondant respectivement à 200 000 et 350 000 cellules HLA-DR<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>.

Les cinétiques de prise de greffe secondaire des deux échantillons primaires testés (graphe B et C) sont assez similaires entre elles et avec celle de la greffe primaire intrafémorale (graphe A)(figure 58).

### 8.2.4.2 Comparaison des phénotypes des cellules humaines leucémiques dans les greffes primaires et secondaires



**Figure 59 : Pourcentage de cellules leucémiques (CD19<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>) et « primitives » (CD34<sup>+</sup>) dans la population humaine (HLA-DR<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>) des fémurs controlatéraux.**

Grappe A : souris Phi+1 ainsi que les receveurs secondaires associés (5 souris ; sacrifiées entre J30 et J45);

Grappe B : souris traitées 3 Phi+1 et ses receveurs secondaires (5 souris ; sacrifiées à J40).

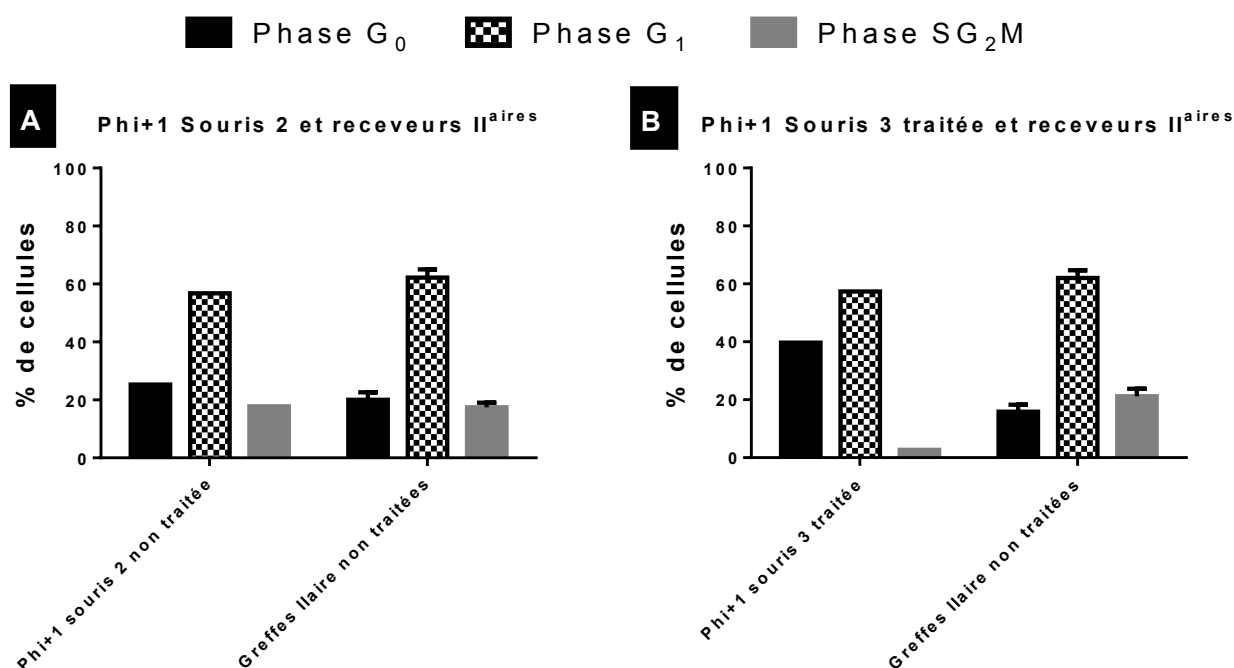
Le graphe A de la figure 59 montre que le phénotype de la population humaine xéno greffée dans les cinq receveuses secondaires (souris 2-1 à 2-5), est : - identique à celui observé dans la souris 2 avant transplantation ; - homogène (faible écart-type calculé).

Le graphe B de la figure 59 montre des résultats similaires, un phénotype homogène et identique entre celui de la souris donneuse post 5-FU et les cinq souris receveuses non traitées.



De plus, peu de différences sont retrouvées entre les 2 groupes de receveurs secondaires. Le traitement au 5-FU de la souris 3 Phi+1 n'a donc pas sélectionné de sous-population particulièrement résistante.

### 8.2.4.3 Comparaison du cycle des cellules leucémiques après la greffe primaire et la greffe secondaire



**Figure 60 : Distribution dans les phases du cycle cellulaire de la population humaine (HLA-DR<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup>) des fémurs controlatéraux.**

Graphe A : souris n°2 Phi+1 (greffe primaire) et ses receveurs secondaires (m+/-SE de 5 souris) ;

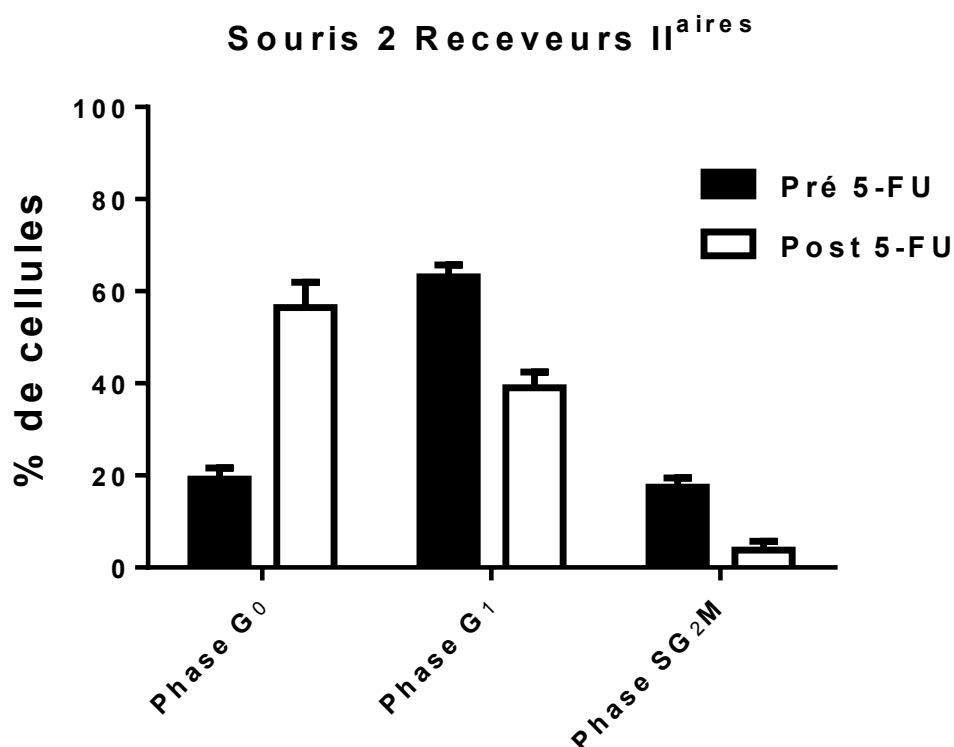
Graphe B : souris traitées n°3 Phi+1 et ses receveurs secondaires (m+/-SE de 5 souris)

Pour les cinq receveuses secondaires de la souris 2, le graphe A (figure 60) montre une répartition de la population humaine xéno greffée, dans les phases du cycle cellulaire : - pratiquement identique à celle observée dans la souris 2 greffe primaire ; - homogène dans chaque phase (faible écart-type calculé).

Le graphe B (figure 60) montre aussi des résultats homogènes entre les cinq receveuses secondaires de la souris 2 (faible écart-type calculé). La comparaison avec le donneur primaire traité par le 5-FU (souris 3) montre une augmentation du pourcentage de cellules

dans les phases actives du cycle. Le pourcentage de cellules quiescentes diminue de moitié, la proportion de cellules en SG<sub>2</sub>M est multiplié par un facteur 8 (2,7% versus 23%).

La comparaison des deux groupes de receveurs secondaires, montre une répartition quasi identique des cellules dans les phases du cycle. Les modifications observées entre les deux séries sont donc dues essentiellement à la sélection des cellules quiescentes par le 5-FU.



**Figure 61 :** Distribution dans le cycle cellulaire de la population humaine (HLA-DR<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>) de 3 receveurs secondaires pré et post injections de 5-FU, souris n°2 Phi+1.

Le traitement au 5-FU de trois des cinq receveurs secondaires de la souris 2 montre une augmentation de la quiescence cellulaire qui passe de 20% à pratiquement 60% (figure 61). Les autres phases du cycle diminuent. La phase G<sub>1</sub> passe de 63% à 39%. Les phases SG<sub>2</sub>M de 17,5% à 3,5%. On observe donc un effet du 5-FU assez semblable à celui observé lors des greffes primaires.

#### **8.2.4.4 Greffes tertiaires**

Un dixième de la moelle provenant des fémurs controlatéraux de deux receveurs secondaires 2 Phi+1 (un non traité et un traité au 5-FU), a été transplanté dans un receveur tertiaire. Un mois post transplantation, les deux souris ont été sacrifiées et leurs fémurs analysés. Les 2 souris étaient chimériques avec des profils d'expression du CD34 similaire. Ces données montrent que des CIL à long terme sont toujours présentes dans ces animaux.

### 8.3 Synthèse des résultats obtenus

Les résultats présentés ci-dessus ont été obtenus suite à une xéno greffe de cellules de 3 patients pédiatriques atteints de LAL différentes, dans des souris NSG.

La contamination de la colonie de souris par *Helicobacter hepaticus* détectée en cours d'expérimentation ne nous permet pas de garantir la fiabilité de ces résultats qui sont donc préliminaires et **devront être confirmés**.

#### 8.3.1 Analyse de la greffe de cellules primaires

Dans ces expériences, nous avons montré que 80% des souris transplantées en intra-fémoral avec des cellules de patients, greffent avec des cinétiques : - différentes entre les échantillons ; - globalement identiques pour un même échantillon dans un groupe de souris. L'étude des marqueurs phénotypiques confirme que les cellules humaines greffées présentent un profil de LAL-B avec une population cellulaire « primitive » (CD34<sup>+</sup>) croissante en fonction du temps et d'importance variable selon le type de la leucémie. Nous observons une prise de greffe plus rapide et une population CD34<sup>+</sup> importante dans les souris greffées avec l'échantillon de LAL de mauvais pronostic (Phi+1).

L'analyse des rates et des fémurs controlatéraux des animaux sacrifiés, montre que l'infiltration leucémique y est plus modérée que dans le fémur injecté, suggérant deux étapes dans le développement de la leucémie : - une première étape de nidation et de prolifération dans le fémur injecté ; - une étape secondaire plus tardive de migration et d'implantation dans les autres territoires hématopoïétiques. Le phénotype de la population cellulaire étant identique dans tous les tissus (fémur transplanté, controlatéral et rate), ces résultats suggèrent qu'une population de CIL, capable de migrer et de se développer, est à l'origine de la LAL-B dans ces animaux. Pour l'échantillon Phi+1, cette donnée est appuyée par nos expériences de transplantation en série de moelle provenant de fémurs non injectés, à des receveurs secondaires et tertiaires qui ont tous développés avec des cinétiques identiques, la même leucémie que celle du receveur primaire.

L'étude du cycle cellulaire montre qu'une partie de la population humaine leucémique médullaire est quiescente. Toutefois, la proportion de cellules quiescentes est plus importante dans les tissus peu envahis (fémurs controlatéraux en général) suggérant une corrélation négative entre la quiescence et le chimérisme.

Le faible chimérisme des cellules humaines explique l'absence de splénomégalie chez ces animaux alors qu'elle est observée chez les souris transplantées avec la lignée NALM6.

### **8.3.2 Effet du traitement au 5-FU**

Le traitement au 5-FU des souris xénogreffées, entraîne une cytopénie splénique et médullaire sans sélection d'une sous-population leucémique « primitive » ( $CD34^+$  ou  $CD34^+CD10^-$  ou  $CD34^+CD19^-$ ). La cytotoxicité du 5-FU est similaire pour les cellules humaines et murines.

Nous montrons que le traitement au 5-FU des souris entraîne : - une forte augmentation du pourcentage des cellules leucémiques quiescentes résiduelles des fémurs injectés ; - une augmentation beaucoup plus modérée du pourcentage de la population leucémique quiescente résiduelle des fémurs controlatéraux (plus quiescente avant le traitement).

Pour l'échantillon Ph+1, la xénogreffe de cellules de moelle d'une souris traitée à des receveurs secondaires puis tertiaires a montré : - des cinétiques de prise de greffe identiques ; - le développement d'une leucémie phénotypiquement similaire à celle observée dans les greffes primaires ; - une diminution de la population leucémique quiescente, équivalente à celle d'un donneur non traité. Ces résultats suggèrent qu'une partie de la population des cellules résiduelles est quiescente, capable de résister au 5-FU et de reproduire rapidement la leucémie d'origine lors de transplantations sériées. Ces cellules résiduelles répondent à la définition de CIL.

**Discussion**  
**Conclusion**  
**Perspectives**



Certaines rechutes sont dues à la persistance prolongée de cellules dormantes avec des propriétés de CSH, les CIL, capables de ré-induire une leucémie (Essers and Trumpp, 2010). En 2007, Ishikawa *et al.* ont identifié dans les LAM des CIL chimiorésistantes quiescentes, localisées dans les régions endostéales de la moelle osseuse (Ishikawa et al., 2007), ce qui suggère un rôle fondamental de l'environnement. La présence de CIL quiescentes dans les LAL est controversée et reste à ce jour peu explorée.

Parmi les nombreux facteurs intervenant dans le maintien en quiescence des CSPH normaux, la concentration d'O<sub>2</sub>, auquel notre groupe s'intéresse, joue un rôle clef longtemps ignoré. L'expérience que nous avons acquise dans le domaine de la quiescence des CSH en hypoxie nous a amenés à explorer la contribution de ce facteur environnemental dans la dormance des cellules initiatrices de LAL impliquées dans la chimiorésistance et les rechutes parfois tardives.

Dans ce manuscrit, nous montrons avec la lignée NALM6, que des cellules de LAL peuvent survivre *in vitro* à des concentrations d'O<sub>2</sub> extrêmement faibles (0,1% O<sub>2</sub>) durant 7 jours voire plusieurs semaines et ce, sans induction d'apoptose et sans induction de la différenciation (résultats non développés dans ce manuscrit). La xénogreffe dans des souris NSG après une culture de 7 jours à 0,1% d'O<sub>2</sub>, montre que la majorité des CIL NALM6 sont capables dans des conditions extrêmes de mettre en place des mécanismes de survie permettant leur préservation. Ces résultats rejoignent ceux d'une étude publiée en 2011 qui montrait que la culture de 48h à 1% d'O<sub>2</sub> n'induisait pas d'apoptose de la lignée NALM6. Il faut souligner que dans ce travail, les auteurs n'observent pas d'inhibition de croissance (Benito et al., 2011) contrairement à notre étude. En effet, comme montré avec des CSPH (Guitart et al., 2011; Hermitte et al., 2006), cette survie à 0,1% d'O<sub>2</sub> est accompagnée *in vitro* d'une forte entrée en quiescence des blastes, mise en évidence par une perte progressive de l'antigène nucléaire Ki67. La mesure de l'activité de la  $\beta$ -galactosidase (résultats non présentés ici) par un substrat fluorescent (le C<sub>12</sub>FDG) ne montre aucune induction de la sénescence cellulaire, confirmant un état de dormance en sortie de LC1 (Debacq-Chainiaux et al., 2009).

Certains mécanismes impliqués dans la quiescence des cellules normales ont aussi été observés dans le modèle leucémique NALM6, à savoir une non phosphorylation des sites S807/811 et S780 de pRB qui permet la séquestration des protéines c-abl et E2F dont les



formes libres sont indispensables à la progression dans le cycle cellulaire (Guitart et al., 2011). L'étude de l'expression des deux autres membres de la famille de pRB (p107 et p130) ainsi que celle des inhibiteurs CIP/KIP (p21, p27 et p57) des complexes Cyclin/CDK, est en cours d'exploration pour confirmer la quiescence cellulaire.

L'utilisation d'un marqueur de phase S (EdU) indique que la quiescence d'une partie des cellules NALM-6 induite par l'hypoxie, est profonde avec un arrêt du cycle du quatrième au septième jour de culture. Ces observations nous ont amené à nous interroger sur les relations entre cette quiescence et la dormance cellulaire qui permet à la cellule dont l'activité métabolique est très réduite de résister aux chimiothérapies (Aguirre-Ghiso, 2007). L'Ara-C et le 5-FU qui créent des dommages à l'ADN durant la phase de réplication ou la vincristine qui bloque la mitose, sont logiquement inefficaces sur des cellules quiescentes qui ne cyclent pas. Les tests de clonogénicité, de repeuplement d'une culture liquide ainsi que des tests de transplantation, ont montré que des CIL NALM6 cultivées à 0,1% d'O<sub>2</sub> peuvent persister et ré-induire *in vivo* et *in vitro* une leucémie NALM6 après un traitement par le 5-FU de plus de 4 jours.

Nous avons aussi montré que ces mêmes cellules résistent à des agents aux mécanismes d'actions différents : La Daunorubicine (Anthracycline) et la Methylprednisolone (Glucocorticoïde) qui sont très souvent utilisés dans le traitement des LAL. Les pompes d'efflux des agents cytotoxiques, exprimées majoritairement par les CSH (Zhou et al., 2001), induisent une chimiorésistance (Challen and Little, 2006). La recherche infructueuse d'une augmentation du phénotype « Side Population » des blastes cultivés en hypoxie, n'a pas montré d'implication des pompes ABCG2 dans la chimiorésistance de notre lignée (résultats non présentés dans ce manuscrit). Un des mécanismes de résistance possible des cellules NALM-6 en hypoxie est une sous régulation des facteurs pro-apoptotiques normalement activés par la Daunorubicine et la Methylprednisolone.

Ces résultats indiquent que les CIL de la lignée NALM6 en hypoxie profonde peuvent s'adapter rapidement en activant certains mécanismes de survie des CSPH. Notamment, une profonde dormance cellulaire qui leur confère une meilleure résistance face aux agressions du milieu extérieur et donc face aux chimiothérapies. La xéno greffe de la lignée NALM6 à des souris NSG suivie d'un traitement *in vivo* au 5-FU (analyse en CMF à J28), confirme une meilleure chimiorésistance des cellules NALM6 quiescentes (50% des blastes

résiduels sont quiescents vs 1% dans les animaux contrôles non traités) dont des CIL, capables de ré-induire une leucémie NALM6 lors de transplantations en série.

La présence de concentrations d'O<sub>2</sub> de 3% à 1% au sein du tissu hématopoïétique et maintenant communément admise. Une étude assez ancienne, basée sur des modèles mathématiques, prédit que des zones de la moelle osseuse humaine éloignées de 10 couches cellulaires ou plus des vaisseaux sont presque anoxiques (Chow et al., 2001a, 2001b). Une étude très récente réalisée dans la calvaria murine avec des sondes capables de mesurer le niveau d'oxygénation montre que les plus faibles concentrations d'O<sub>2</sub> (environ 0,6% d'O<sub>2</sub>) sont mesurées à proximité des sinusoïdes (Spencer et al., 2014). Ces résultats, assez différents de ceux mentionnés plus haut, n'apportent pas de justification évidente à notre utilisation de 0,1% et posent donc la question de la valeur « physiologique » de nos résultats. Il faut cependant souligner que pour parvenir aux cellules les plus hypoxiques, ces sondes doivent diffuser à partir des vaisseaux. Ceci introduit un autre paramètre difficile à évaluer, la perfusion des capillaires et des sinusoïdes très peu abordé à ce jour. Ne pouvant considérer l'O<sub>2</sub> comme unique facteur régulateur de l'entrée en quiescence, nous avons entrepris des travaux d'histologie afin de localiser des zones du tissu hématopoïétique spécialisées dans la dormance des CIL jouant un rôle protecteur tel que la niche hématopoïétique ou des sites sanctuaires. Le statut hypoxique de ces zones sera particulièrement regardé.

Les amas de cellules NALM6 visibles sur les coupes 21 jours post-transplantation, suggèrent un développement clonal de la leucémie, à partir de CIL capables de migrer et de se nicher au sein du tissu hématopoïétique. La répartition similaire de ces amas blastiques dans la moelle osseuse (Epiphyse, métaphyse ou diaphyse) ainsi que le sacrifice tardif des souris xénogreffées (amas denses en blastes, de 1 mm de diamètre) ne permettent pas d'observer un site préférentiel initial de migration, supposé métaphysaire et endostéal comme montré pour la xénogreffe des CSH humaines (Ellis et al., 2011; Guezguez et al., 2013; Xie et al., 2008). De nouvelles expériences avec un sacrifice plus précoce des souris ont été planifiées afin d'identifier et de localiser des amas blastiques contenant quelques dizaines de cellules. Nous montrons par un marquage Ki67 et Caspase 3 clivée que peu de blastes dans ces zones sont quiescents et apoptotiques, ce qui confirme nos résultats préliminaires en CMF. Seules quelques rares cellules sont

dormantes, ce qui ne nous permet pas de mettre en évidence un site inducteur de quiescence tel que la niche hématopoïétique par exemple. De plus, il a été montré dans la littérature par un marquage au Pimonidazole (17 jours post transplantation) que ces amas sont plus hypoxiques que le reste du tissu hématopoïétique, dus à la prolifération des blastes qui augmente la consommation d'O<sub>2</sub> (Benito et al., 2011). Ces données ainsi que la faible sensibilité du marquage au Pimonidazole rendent cette technique peu appropriée à ce stade du développement de la maladie et conforte notre choix d'analyse à des temps plus précoces après greffe. L'absence de vascularisation murine permet aussi d'expliquer la diminution de la concentration d'O<sub>2</sub> rencontrée au sein des amas de cellules NALM6 qui présentent une structure ressemblant à celle des tumeurs solides. Un marquage Ki67 sur des souris sacrifiées plus tardivement (à J25) pourrait mettre en évidence une zone centrale très hypoxique lorsque la tumeur est plus développée et qui se traduirait par un foyer central de cellules quiescentes.

Le traitement au 5-FU de ces souris suggère une meilleure préservation de la cellularité totale des zones juxta-endostéales de la métaphyse. Ces résultats sont en accord avec ceux déjà publiés qui montrent après radiothérapie ou chimiothérapie, une persistance dans les régions endostéales des péricytes et des artérioles de la niche hématopoïétique normale, (Hooper et al., 2009; Kunisaki et al., 2013). Comme montré en CMF, les cellules résistantes au 5-FU sont quiescentes mais nous n'avons pas détecté de région médullaire (diaphyse, métaphyse ou épiphyse) favorisant la chimiorésistance des blastes au 5-FU comme des foyers denses en cellules quiescentes résiduelles localisés dans les zones endostéales ou centro-médullaires. Il est probable que la quantité importante de cellules humaines au sein des amas a entraîné une modification de la structure de la matrice extracellulaire ou de la niche hématopoïétique.

Tout au long de la vie des individus, le tissu hématopoïétique est remodelé. Avec l'âge, la proportion d'adipocytes dans la moelle osseuse augmente ce qui conduit à une modification de sa structure et de sa couleur (renommée : moelle jaune). Peu de travaux ont été effectués sur la recherche de cellules quiescentes isolées dans la moelle jaune. En 2009, Naveiras *et al.* ont montré que la moelle des vertèbres caudales de souris âgées de 12 semaines est beaucoup plus adipeuse que celle des vertèbres thoraciques et présente une hématopoïèse « normale » différente avec des CSPH et des précurseurs moins

proliférants (diminution phase SG<sub>2</sub>M) (Naveiras et al., 2009). En regard de ces résultats, nous nous sommes demandé si ces sites pourraient servir de sanctuaire pour les CIL, peu accessibles aux drogues car peu perfusés et contenant surtout des cellules « dormantes » expliquant en partie la fréquence élevée des rechutes chez les patients âgés. Des travaux prochains seront réalisés en histologie afin de mettre en évidence le statut hypoxique de ces sites sanctuaires éventuels de la moelle jaune avec une recherche de la présence de CIL quiescentes (avant et après traitement au 5-FU). Les premières colorations en Trichrome de Masson suggèrent une meilleure résistance au 5-FU de ce tissu que la moelle des vertèbres thoraciques (données préliminaires à confirmer et non montrées dans ce manuscrit).

En conclusion, cette étude a l'intérêt d'avoir permis d'optimiser et de valider des techniques adaptées à l'étude des LAL humaines dans un modèle de xénogreffe. Elle devra être complétée pour au moins deux raisons : les souris utilisées présentaient un problème d'infection chronique par *Helicobacter hepaticus* et nous avons utilisé une lignée leucémique. Toutefois, nous en avons retiré quelques informations intéressantes sur la progression tumorale, la quiescence et la chimiorésistance qui seront utiles pour l'analyse des cellules de patients. Cette étude sera déterminante pour mieux connaître et comprendre les mécanismes conduisant à la quiescence et à la chimiorésistance dans les LAL.

Nous avons commencé à nous intéresser aux cellules de patients. Les résultats de ce manuscrit ont été obtenus à partir de 3 échantillons de patients pédiatriques non traités. La culture en normoxie ou en hypoxie des cellules primaires des LAL s'étant avérée compliquée (résultats non montrés dans ce manuscrit), nous nous sommes focalisés sur des expériences *in vivo* afin de mettre en évidence une relation entre l'hypoxie médullaire, la quiescence des CIL et leur chimiorésistance. La contamination à *Helicobacter hepaticus* détectée dans la colonie de souris a ralenti notre étude et nous a fait envisager un biais expérimental dans les résultats de ce manuscrit qui nécessitent d'être vérifiés.

Les mauvais résultats de prise de greffe montrés dans la littérature (le Viseur et al., 2008) nous ont amené à choisir une méthode de transplantation en intrafémoral afin d'assurer la xénogreffe. Grâce à cette technique, plus de 80% des animaux montrent une infiltration leucémique humaine. Cherchant à identifier phénotypiquement une population de CIL, nous

avons caractérisé les leucémies xénogreffées avec les marqueurs CD10, CD19 et CD34 décrits dans la littérature (Cobaleda et al., 2000; Cox et al., 2004; Lutz et al., 2013; Rehe et al., 2013; le Viseur et al., 2008) afin de rechercher une corrélation entre la proportion de cellules « primitives » et le pronostic de la leucémie, complétant ainsi les travaux déjà publiés. Les profils phénotypiques observés en CMF ne permettent pas d'identifier de sous-population cellulaire différente avec les marqueurs CD10 et CD19 (100% de la population est CD10<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>). Dans nos expériences, seul le marqueur de primitivité CD34 semble fiable et utilisable pour caractériser des sous-populations xénogreffées. Rejoignant une étude publiée en 2011 (Meyer et al., 2011), nos résultats montrent une prise de greffe plus rapide pour l'échantillon de mauvais pronostic BCR-ABL, plus enrichi en cellules primitives, par rapport à l'échantillon de pronostic favorable ETV6-RUNX1.

Pour chaque souris analysée lors du sacrifice, les LAL montrent une infiltration bien plus importante dans le fémur injecté que dans le fémur controlatéral dans lequel la proportion de cellules humaines quiescentes est plus importante. Ces résultats suggèrent un développement de la leucémie dans l'animal en deux temps : une première étape d'implantation, d'adaptation et d'expansion des blastes, suivie dans un deuxième temps, sous l'influence de facteurs qui restent à déterminer, d'une migration de CIL (la population infiltrée présente le même profil d'expression du CD34) vers d'autres tissus hématopoïétiques. La présence dans les fémurs controlatéraux d'une population humaine quiescente plus importante que celle des fémurs injectés suggère que l'implantation s'effectue dans des régions qui favorisent et entretiennent la quiescence des CIL comme la niche hématopoïétique. Les 3 échantillons présentent la même proportion de cellules quiescentes et aucune différence significative n'est relevée. La présence des CIL dans les animaux « BCR-ABL » est définitivement mise en évidence par des expériences de transplantation en série où les receveurs secondaires et tertiaires développent avec la même cinétique une LAL phénotypiquement identique à celle du receveur primaire.

En 2013, Lutz *et al.* ont montré sur des cellules primaires de LAL de patients (BCR-ABL et ETV6-RUNX1) que les cellules leucémiques les plus primitives sont les plus quiescentes, ce qui les rend plus résistantes. Les auteurs montrent que leur disparition lors du traitement du patient est synonyme de rémission complète (Lutz et al., 2013). Comme montré avec la lignée NALM6, la population des cellules quiescentes médullaires est enrichie suite aux

traitements au 5-FU des souris xéno greffées avec les cellules des différents patients. Toutefois, nous n'observons aucune sélection préférentielle des cellules humaines les plus primitives. Le phénotype conservé de la leucémie entre le début et la fin du traitement indique, pour notre modèle d'étude, une proportion de cellules quiescentes identique quelles que soient les sous-populations.

La persistance de CIL dans les receveurs primaires (traités ou non traités) est mise en évidence par la conservation du phénotype des leucémies induites dans les receveurs secondaires après transplantation. Comme déjà évoqué dans la littérature (le Viseur et al., 2008), ces résultats indiquent qu'aucun clone n'est sélectionné entre le receveur primaire et le receveur secondaire qui présente la même maladie composée des mêmes sous-populations cellulaires.

Ces résultats même s'ils sont préliminaires ont le mérite de nous avoir montré, *in vivo*, que des cellules quiescentes de LAL résistaient au 5-FU. Nous avons aussi pu mettre en place une méthodologie efficace de transplantation de cellules primaires à des souris NSG et d'analyse des cellules humaines greffées. La transplantation en intra-fémoral des animaux assure un fort taux de greffe mais ne permet pas d'évaluer le taux de chimérisme dans les fémurs controlatéraux puisque la cinétique d'infiltration est variable d'un échantillon à l'autre, ce qui induit des résultats très hétérogènes et difficilement comparables. La transplantation en intra-veineux de moelle de souris xéno greffées Phi+1 à des receveurs secondaires montrant le développement d'une leucémie identique, des résultats d'analyse très homogènes, l'emploi de receveurs secondaires pour la suite de nos travaux sera privilégié.

En plus de la confirmation de ces résultats, plusieurs études restent à mener avec les échantillons de cellules de patients :

- ✓ Une étude de coupes histologiques identique à celle de la NALM6 lorsqu'elle sera complète afin de mettre en évidence un rôle des faibles concentrations d'oxygène dans la quiescence des CIL primaires
- ✓ Une étude pharmacologique *in vivo* avec les drogues classiquement utilisées pour traiter les patients et décrites dans le paragraphe 1.1.2.

## *Discussion, conclusion et perspectives*

- ✓ Une étude *in vitro* de test de drogues afin de mettre au point un système de culture permettant de sélectionner pour chaque patient, la meilleure stratégie de traitement pour cibler les cellules quiescentes comme évoqué dernièrement dans la littérature pour le modèle des LAM (Griessinger et al., 2014; Saito et al., 2010b)

## Bibliographie

- Adams, G.B., and Scadden, D.T. (2006). The hematopoietic stem cell in its place. *Nat. Immunol.* 7, 333–337.
- Aguirre-Ghiso, J.A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat. Rev. Cancer* 7, 834–846.
- Ailles, L.E., Gerhard, B., Kawagoe, H., and Hogge, D.E. (1999). Growth Characteristics of Acute Myelogenous Leukemia Progenitors That Initiate Malignant Hematopoiesis in Nonobese Diabetic/Severe Combined Immunodeficient Mice. *Blood* 94, 1761–1772.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 3983–3988.
- Almog, N., Ma, L., Raychowdhury, R., Schwager, C., Erber, R., Short, S., Hlatky, L., Vajkoczy, P., Huber, P.E., Folkman, J., et al. (2009). Transcriptional Switch of Dormant Tumors to Fast-Growing Angiogenic Phenotype. *Cancer Res.* 69, 836–844.
- Anderson, K., Lutz, C., Delft, F.W. van, Bateman, C.M., Guo, Y., Colman, S.M., Kempster, H., Moorman, A.V., Tittley, I., Swansbury, J., et al. (2011). Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature* 469, 356–361.
- Armstrong, S.A., and Look, A.T. (2005). Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia. *J. Clin. Oncol.* 23, 6306–6315.
- Balduzzi, A., Di Maio, L., Silvestri, D., Songia, S., Bonanomi, S., Rovelli, A., Conter, V., Biondi, A., Cazzaniga, G., and Valsecchi, M.G. (2014). Minimal residual disease before and after transplantation for childhood acute lymphoblastic leukaemia: is there any room for intervention? *Br. J. Haematol.* 164, 396–408.
- Bene, M.C., Castoldi, G., Knapp, W., Ludwig, W.D., Matutes, E., Orfao, A., and van't Veer, M.B. (1995). Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 9, 1783–1786.
- Benito, J., Shi, Y., Szymanska, B., Carol, H., Boehm, I., Lu, H., Konoplev, S., Fang, W., Zweidler-McKay, P.A., Campana, D., et al. (2011). Pronounced Hypoxia in Models of Murine and Human Leukemia: High Efficacy of Hypoxia-Activated Prodrug PR-104. *PLoS ONE* 6, e23108.
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., and Sultan, C. (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br. J. Haematol.* 33, 451–458.
- Bergers, G., and Benjamin, L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* 3, 401–410.



## Bibliographie

Bernstein, B.E., Meissner, A., and Lander, E.S. (2007). The Mammalian Epigenome. *Cell* 128, 669–681.

Bernt, K.M., and Armstrong, S.A. (2009). Leukemia stem cells and human acute lymphoblastic leukemia. *Semin. Hematol.* 46, 33–38.

Bhojwani, D., and Pui, C.-H. (2013). Relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol.* 14, e205–e217.

Bhojwani, D., Kang, H., Moskowitz, N.P., Min, D.-J., Lee, H., Potter, J.W., Davidson, G., Willman, C.L., Borowitz, M.J., Belitskaya-Levy, I., et al. (2006). Biologic pathways associated with relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood* 108, 711–717.

Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 3, 730–737.

Borowitz, M.J., Pullen, D.J., Shuster, J.J., Viswanatha, D., Montgomery, K., Willman, C.L., and Camitta, B. (2003). Minimal residual disease detection in childhood precursor-B-cell acute lymphoblastic leukemia: relation to other risk factors. A Children's Oncology Group study. *Leukemia* 17, 1566–1572.

Boyerinas, B., Zafrir, M., Yesilkanal, A.E., Price, T.T., Hyjek, E.M., and Sipkins, D.A. (2013). Adhesion to osteopontin in the bone marrow niche regulates lymphoblastic leukemia cell dormancy. *Blood* 121, 4821–4831.

Buck, S.B., Bradford, J., Gee, K.R., Agnew, B.J., Clarke, S.T., and Salic, A. (2008). Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies. *BioTechniques* 44, 927–929.

Buick, R.N., Minden, M.D., and McCulloch, E.A. (1979). Self-renewal in culture of proliferative blast progenitor cells in acute myeloblastic leukemia. *Blood* 54, 95–104.

Bullwinkel, J., Baron-Lühr, B., Lüdemann, A., Wohlenberg, C., Gerdes, J., and Scholzen, T. (2006). Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J. Cell. Physiol.* 206, 624–635.

Calvi, L.M., Adams, G.B., Weibrecht, K.W., Weber, J.M., Olson, D.P., Knight, M.C., Martin, R.P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F.R., et al. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425, 841–846.

Campana, D. (2009). Role of Minimal Residual Disease Monitoring in Adult and Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 23, 1083–1098.

Campana, D., and Leung, W. (2013). Clinical significance of minimal residual disease in patients with acute leukaemia undergoing haematopoietic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* 162, 147–161.

- Castor, A., Nilsson, L., Åstrand-Grundström, I., Buitenhuis, M., Ramirez, C., Anderson, K., Strömbeck, B., Garwicz, S., Békássy, A.N., Schmiegelow, K., et al. (2005). Distinct patterns of hematopoietic stem cell involvement in acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Med.* *11*, 630–637.
- Challen, G.A., and Little, M.H. (2006). A Side Order of Stem Cells: The SP Phenotype. *STEM CELLS* *24*, 3–12.
- Charville, G.W., and Rando, T.A. (2011). Stem cell ageing and non-random chromosome segregation. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* *366*, 85–93.
- Cheng, T., Rodrigues, N., Shen, H., Yang, Y., Dombkowski, D., Sykes, M., and Scadden, D.T. (2000). Hematopoietic Stem Cell Quiescence Maintained by p21cip1/waf1. *Science* *287*, 1804–1808.
- Cheung, T.H., and Rando, T.A. (2013). Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 329–340.
- Chow, D.C., Wenning, L.A., Miller, W.M., and Papoutsakis, E.T. (2001a). Modeling pO<sub>2</sub> Distributions in the Bone Marrow Hematopoietic Compartment. I. Krogh's Model. *Biophys. J.* *81*, 675–684.
- Chow, D.C., Wenning, L.A., Miller, W.M., and Papoutsakis, E.T. (2001b). Modeling pO<sub>2</sub> Distributions in the Bone Marrow Hematopoietic Compartment. II. Modified Kroghian Models. *Biophys. J.* *81*, 685–696.
- Cipolleschi, M.G., Sbarba, P.D., and Olivotto, M. (1993). The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood* *82*, 2031–2037.
- Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H.M., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L., and Wahl, G.M. (2006). Cancer Stem Cells—Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. *Cancer Res.* *66*, 9339–9344.
- Chen, Y., and Lin, I. (2000). A primitive hematopoietic cell is the target for the leukemic transformation in human Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* *95*, 1007–1013.
- Cornell, R.F., and Palmer, J. (2012). Adult Acute Leukemia. *Dis. Mon.* *58*, 219–238.
- Cox, C.V., Evely, R.S., Oakhill, A., Pamphilon, D.H., Goulden, N.J., and Blair, A. (2004). Characterization of acute lymphoblastic leukemia progenitor cells. *Blood* *104*, 2919–2925.
- Cox, C.V., Diamanti, P., Evely, R.S., Kearns, P.R., and Blair, A. (2009). Expression of CD133 on leukemia-initiating cells in childhood ALL. *Blood* *113*, 3287–3296.
- Danet, G.H., Pan, Y., Luongo, J.L., Bonnet, D.A., and Simon, M.C. (2003). Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. *J. Clin. Invest.* *112*, 126–135.

## Bibliographie

Davidsson, J., Paulsson, K., Lindgren, D., Lilljebjörn, H., Chaplin, T., Forestier, E., Andersen, M.K., Nordgren, A., Rosenquist, R., Fioretos, T., et al. (2010). Relapsed childhood high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia: presence of preleukemic ancestral clones and the secondary nature of microdeletions and RTK-RAS mutations. *Leukemia* 24, 924–931.

Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J.D., Campisi, J., and Toussaint, O. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- $\beta$ gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat. Protoc.* 4, 1798–1806.

DeGregori, J., and Johnson, D. (2006). Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. *Curr. Mol. Med.* 6, 739–748.

Delft, F.W. van, Horsley, S., Colman, S., Anderson, K., Bateman, C., Kempinski, H., Zuna, J., Eckert, C., Saha, V., Kearney, L., et al. (2011). Clonal origins of relapse in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 117, 6247–6254.

Dick, J.E. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 112, 4793–4807.

Ding, L., Saunders, T.L., Enikolopov, G., and Morrison, S.J. (2012). Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* 481, 457–462.

Dumble, M., Moore, L., Chambers, S.M., Geiger, H., Zant, G.V., Goodell, M.A., and Donehower, L.A. (2007). The impact of altered p53 dosage on hematopoietic stem cell dynamics during aging. *Blood* 109, 1736–1742.

Ellis, S.L., Grassinger, J., Jones, A., Borg, J., Camenisch, T., Haylock, D., Bertoncello, I., and Nilsson, S.K. (2011). The relationship between bone, hemopoietic stem cells, and vasculature. *Blood* 118, 1516–1524.

Ema, H., and Suda, T. (2012). Two anatomically distinct niches regulate stem cell activity. *Blood* 120, 2174–2181.

Essers, M.A.G., and Trumpp, A. (2010). Targeting leukemic stem cells by breaking their dormancy. *Mol. Oncol.* 4, 443–450.

Faderl, S., O'Brien, S., Pui, C.-H., Stock, W., Wetzler, M., Hoelzer, D., and Kantarjian, H.M. (2010). Adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 116, 1165–1176.

Forristal, C.E., Winkler, I.G., Nowlan, B., Barbier, V., Walkinshaw, G., and Levesque, J.-P. (2013). Pharmacologic stabilization of HIF-1 $\alpha$  increases hematopoietic stem cell quiescence in vivo and accelerates blood recovery after severe irradiation. *Blood* 121, 759–769.

Frolova, O., Samudio, I., Benito, J.M., Jacamo, R., Kornblau, S.M., Markovic, A., Schober, W., Lu, H., Qiu, Y.H., Buglio, D., et al. (2012). Regulation of HIF-1 $\alpha$  signaling and chemoresistance in acute lymphocytic leukemia under hypoxic conditions of the bone marrow microenvironment. *Cancer Biol. Ther.* 13, 858–870.

- Gandemer, V., Chevret, S., Petit, A., Vermylen, C., Leblanc, T., Michel, G., Schmitt, C., Lejars, O., Schneider, P., Demeocq, F., et al. (2012). Excellent prognosis of late relapses of ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia: lessons from the FRALLE 93 protocol. *Haematologica* 97, 1743–1750.
- Gezer, D., Vukovic, M., Soga, T., Pollard, P.J., and Kranc, K.R. (2014). Genetic dissection of hypoxia signalling pathways in normal and leukaemic stem cells. *STEM CELLS* n/a–n/a.
- Giuriato, S., Ryeom, S., Fan, A.C., Bachireddy, P., Lynch, R.C., Rieth, M.J., Riggelen, J. van, Kopelman, A.M., Passegué, E., Tang, F., et al. (2006). Sustained regression of tumors upon MYC inactivation requires p53 or thrombospondin-1 to reverse the angiogenic switch. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 16266–16271.
- Gleißner, B., Gökbuget, N., Bartram, C.R., Janssen, B., Rieder, H., Janssen, J.W.G., Fonatsch, C., Heyll, A., Voliotis, D., Beck, J., et al. (2002). Leading prognostic relevance of the BCR-ABL translocation in adult acute B-lineage lymphoblastic leukemia: a prospective study of the German Multicenter Trial Group and confirmed polymerase chain reaction analysis. *Blood* 99, 1536–1543.
- Gökbuget, N. (2013). How I treat older patients with ALL. *Blood* 122, 1366–1375.
- Greaves, M. (2006). Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* 6, 193–203.
- Greaves, M., and Boffler, P.A. (2009). Infections in early life and risk of childhood ALL. *Br. J. Cancer* 100, 863–863.
- Griessinger, E., Anjos-Afonso, F., Pizzitola, I., Rouault-Pierre, K., Vargaftig, J., Taussig, D., Gribben, J., Lassailly, F., and Bonnet, D. (2014). A niche-like culture system allowing the maintenance of primary human acute myeloid leukemia-initiating cells: a new tool to decipher their chemoresistance and self-renewal mechanisms. *Stem Cells Transl. Med.* 3, 520–529.
- Guan, Y., Gerhard, B., and Hogge, D.E. (2003). Detection, isolation, and stimulation of quiescent primitive leukemic progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 101, 3142–3149.
- Guezguez, B., Campbell, C.J.V., Boyd, A.L., Karanu, F., Casado, F.L., Di Cresce, C., Collins, T.J., Shapovalova, Z., Xenocostas, A., and Bhatia, M. (2013). Regional Localization within the Bone Marrow Influences the Functional Capacity of Human HSCs. *Cell Stem Cell* 13, 175–189.
- Guitart, A.V., Debeissat, C., Hermitte, F., Villacreces, A., Ivanovic, Z., Boeuf, H., and Praloran, V. (2011). Very low oxygen concentration (0.1%) reveals two FDCP-Mix cell subpopulations that differ by their cell cycling, differentiation and p27KIP1 expression. *Cell Death Differ.* 18, 174–182.
- Guitart, A.V., Subramani, C., Armesilla-Diaz, A., Smith, G., Sepulveda, C., Gezer, D., Vukovic, M., Dunn, K., Pollard, P., Holyoake, T.L., et al. (2013). Hif-2 $\alpha$  is not essential for cell-autonomous hematopoietic stem cell maintenance. *Blood* 122, 1741–1745.

## Bibliographie

Hermitte, F., Brunet de la Grange, P., Belloc, F., Praloran, V., and Ivanovic, Z. (2006). Very Low O<sub>2</sub> Concentration (0.1%) Favors G<sub>0</sub> Return of Dividing CD34<sup>+</sup> Cells. *STEM CELLS* 24, 65–73.

Hock, H., Hamblen, M.J., Rooke, H.M., Schindler, J.W., Saleque, S., Fujiwara, Y., and Orkin, S.H. (2004). Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. *Nature* 431, 1002–1007.

Hong, D., Gupta, R., Ancliff, P., Atzberger, A., Brown, J., Soneji, S., Green, J., Colman, S., Piacibello, W., Buckle, V., et al. (2008). Initiating and Cancer-Propagating Cells in TEL-AML1-Associated Childhood Leukemia. *Science* 319, 336–339.

Hooper, A.T., Butler, J.M., Nolan, D.J., Kranz, A., Iida, K., Kobayashi, M., Kopp, H.-G., Shido, K., Petit, I., Yanger, K., et al. (2009). Engraftment and Reconstitution of Hematopoiesis Is Dependent on VEGFR2-Mediated Regeneration of Sinusoidal Endothelial Cells. *Cell Stem Cell* 4, 263–274.

Hosen, N., Park, C.Y., Tatsumi, N., Oji, Y., Sugiyama, H., Gramatzki, M., Krensky, A.M., and Weissman, I.L. (2007). CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 11008–11013.

Hurwitz, R., Hozier, J., LeBien, T., Minowada, J., Gajl-Peczalska, K., Kubonishi, I., and Kersey, J. (1979). Characterization of a leukemic cell line of the pre-B phenotype. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 23, 174–180.

Hüttmann, A., Liu, S.L., Boyd, A.W., and Li, C.L. (2001). Functional heterogeneity within rhodamine123<sup>lo</sup> Hoechst33342<sup>lo</sup>/sp primitive hemopoietic stem cells revealed by pyronin Y. *Exp. Hematol.* 29, 1109–1116.

Ibágy, A., Silva, D.B., Seiben, J., Winneshoffer, A.P.F.F., Costa, T.E.J.B., Dacoregio, J.S., Costa, I., and Faraco, D. (2013). Acute Lymphoblastic Leukemia in Infants: 20 years of Experience. *J. Pediatr. (Rio J.)* 89, 64–69.

Ichihara, E., Kaneda, K., Saito, Y., Yamakawa, N., and Morishita, K. (2011). Angiopoietin1 contributes to the maintenance of cell quiescence in EVI1<sup>high</sup> leukemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 416, 239–245.

Inaba, H., and Pui, C.-H. (2010). Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol.* 11, 1096–1106.

Inaba, H., Greaves, M., and Mullighan, C.G. (2013). Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet* 381, 1943–1955.

Ishikawa, F., Yoshida, S., Saito, Y., Hijikata, A., Kitamura, H., Tanaka, S., Nakamura, R., Tanaka, T., Tomiyama, H., Saito, N., et al. (2007). Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nat. Biotechnol.* 25, 1315–1321.

- Ivanović, Z., Sbarba, P.D., Trimoreau, F., Faucher, J.-L., and Praloran, V. (2000). Primitive human HPCs are better maintained and expanded in vitro at 1 percent oxygen than at 20 percent. *Transfusion (Paris)* 40, 1482–1488.
- Jiang, B.H., Semenza, G.L., Bauer, C., and Marti, H.H. (1996). Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension. *Am. J. Physiol.* 271, C1172–1180.
- Kaelin Jr., W.G., and Ratcliffe, P.J. (2008). Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway. *Mol. Cell* 30, 393–402.
- Kamel-Reid, S., Letarte, M., Sirard, C., Doedens, M., Grunberger, T., Fulop, G., Freedman, M.H., Phillips, R.A., and Dick, J.E. (1989). A model of human acute lymphoblastic leukemia in immune-deficient SCID mice. *Science* 246, 1597–1600.
- Kampen, K.R. (2012). The discovery and early understanding of leukemia. *Leuk. Res.* 36, 6–13.
- Kaplan, R.N., Rafii, S., and Lyden, D. (2006). Preparing the “Soil”: The Premetastatic Niche. *Cancer Res.* 66, 11089–11093.
- Katayama, Y., Battista, M., Kao, W.-M., Hidalgo, A., Peired, A.J., Thomas, S.A., and Frenette, P.S. (2006). Signals from the Sympathetic Nervous System Regulate Hematopoietic Stem Cell Egress from Bone Marrow. *Cell* 124, 407–421.
- Kim, A.S., Eastmond, D.A., and Preston, R.J. (2006). Childhood acute lymphocytic leukemia and perspectives on risk assessment of early-life stage exposures. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 613, 138–160.
- Kmiecniak, M., Payne, K.K., Wang, X.-Y., and Manjili, M.H. (2013). IFN- $\gamma$  R $\alpha$  Is a Key Determinant of CD8<sup>+</sup> T Cell-Mediated Tumor Elimination or Tumor Escape and Relapse in FVB Mouse. *PLoS ONE* 8, e82544.
- Kong, Y., Yoshida, S., Saito, Y., Doi, T., Nagatoshi, Y., Fukata, M., Saito, N., Yang, S.M., Iwamoto, C., Okamura, J., et al. (2008). CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> as well as CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup> cells are leukemia-initiating cells with self-renewal capacity in human B-precursor ALL. *Leukemia* 22, 1207–1213.
- Kops, G.J.P.L., Medema, R.H., Glassford, J., Essers, M.A.G., Dijkers, P.F., Coffey, P.J., Lam, E.W.-F., and Burgering, B.M.T. (2002). Control of Cell Cycle Exit and Entry by Protein Kinase B-Regulated Forkhead Transcription Factors. *Mol. Cell. Biol.* 22, 2025–2036.
- Krivtsov, A.V., Twomey, D., Feng, Z., Stubbs, M.C., Wang, Y., Faber, J., Levine, J.E., Wang, J., Hahn, W.C., Gilliland, D.G., et al. (2006). Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL–AF9. *Nature* 442, 818–822.
- Kuiper, R.P., Waanders, E., Velden, V.H.J. van der, Reijmersdal, S.V. van, Venkatachalam, R., Scheijen, B., Sonneveld, E., Dongen, J.J.M. van, Veerman, A.J.P., Leeuwen, F.N. van, et al. (2010). IKZF1 deletions predict relapse in uniformly treated pediatric precursor B-ALL. *Leukemia* 24, 1258–1264.

## Bibliographie

Kumar, R., Stepanek, F., and Mantalaris, A. (2004). An Oxygen Transport Model for Human Bone Marrow Microcirculation. *Food Bioprod. Process.* 82, 105–116.

Kunisaki, Y., Bruns, I., Scheiermann, C., Ahmed, J., Pinho, S., Zhang, D., Mizoguchi, T., Wei, Q., Lucas, D., Ito, K., et al. (2013). Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature* 502, 637–643.

Kuster, L., Grausenburger, R., Fuka, G., Kaindl, U., Krapf, G., Inthal, A., Mann, G., Kauer, M., Rainer, J., Kofler, R., et al. (2011). ETV6/RUNX1-positive relapses evolve from an ancestral clone and frequently acquire deletions of genes implicated in glucocorticoid signaling. *Blood* 117, 2658–2667.

Kuwatsuka, Y., Minami, M., Minami, Y., Sugimoto, K., Hayakawa, F., Miyata, Y., Abe, A., Goff, D.J., Kiyoi, H., and Naoe, T. (2011). The mTOR inhibitor, everolimus (RAD001), overcomes resistance to imatinib in quiescent Ph-positive acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood Cancer J.* 1, e17.

Lacorazza, H.D., Yamada, T., Liu, Y., Miyata, Y., Sivina, M., Nunes, J., and Nimer, S.D. (2006). The transcription factor MEF/ELF4 regulates the quiescence of primitive hematopoietic cells. *Cancer Cell* 9, 175–187.

Lane, S.W., Scadden, D.T., and Gilliland, D.G. (2009). The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *Blood* 114, 1150–1157.

Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., and Dick, J.E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Publ. Online* 17 Febr. 1994 Doi101038367645a0 367, 645–648.

Lechman, E.R., Gentner, B., van Galen, P., Giustacchini, A., Saini, M., Boccalatte, F.E., Hiramatsu, H., Restuccia, U., Bachi, A., Voisin, V., et al. (2012). Attenuation of miR-126 Activity Expands HSC In Vivo without Exhaustion. *Cell Stem Cell* 11, 799–811.

Lévesque, J.-P., Winkler, I.G., Hendy, J., Williams, B., Helwani, F., Barbier, V., Nowlan, B., and Nilsson, S.K. (2007). Hematopoietic Progenitor Cell Mobilization Results in Hypoxia with Increased Hypoxia-Inducible Transcription Factor-1 $\alpha$  and Vascular Endothelial Growth Factor A in Bone Marrow. *STEM CELLS* 25, 1954–1965.

Lévesque, J.-P., Helwani, F.M., and Winkler, I.G. (2010). The endosteal “osteoblastic” niche and its role in hematopoietic stem cell homing and mobilization. *Leukemia* 24, 1979–1992.

Li, L., and Clevers, H. (2010). Coexistence of Quiescent and Active Adult Stem Cells in Mammals. *Science* 327, 542–545.

Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I.R., Lu, L., Irvin, D., Black, K.L., and Yu, J.S. (2006). Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol. Cancer* 5, 67.

- Liu, Y., Elf, S.E., Miyata, Y., Sashida, G., Liu, Y., Huang, G., Di Giandomenico, S., Lee, J.M., Deblasio, A., Menendez, S., et al. (2009). p53 Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence. *Cell Stem Cell* 4, 37–48.
- Longley, D.B., Harkin, D.P., and Johnston, P.G. (2003). 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* 3, 330–338.
- Lutz, C., Woll, P.S., Hall, G., Castor, A., Dreau, H., Cazzaniga, G., Zuna, J., Jensen, C., Clark, S.A., Biondi, A., et al. (2013). Quiescent leukaemic cells account for minimal residual disease in childhood lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* 27, 1204–1207.
- Mancini, M., Scappaticci, D., Cimino, G., Nanni, M., Derme, V., Elia, L., Tafuri, A., Vignetti, M., Vitale, A., Cuneo, A., et al. (2005). A comprehensive genetic classification of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of the GIMEMA 0496 protocol. *Blood* 105, 3434–3441.
- Matsumoto, A., Takeishi, S., Kanie, T., Susaki, E., Onoyama, I., Tateishi, Y., Nakayama, K., and Nakayama, K.I. (2011). p57 Is Required for Quiescence and Maintenance of Adult Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 9, 262–271.
- McCulloch, E.A., and Till, J.E. (1981). Blast cells in acute myeloblastic leukemia: a model. *Blood Cells* 7, 63–77.
- Méndez-Ferrer, S., Michurina, T.V., Ferraro, F., Mazloom, A.R., MacArthur, B.D., Lira, S.A., Scadden, D.T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G.N., and Frenette, P.S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466, 829–834.
- Meyer, L.H., Eckhoff, S.M., Queudeville, M., Kraus, J.M., Giordan, M., Stursberg, J., Zangrando, A., Vendramini, E., Möricke, A., Zimmermann, M., et al. (2011). Early Relapse in ALL Is Identified by Time to Leukemia in NOD/SCID Mice and Is Characterized by a Gene Signature Involving Survival Pathways. *Cancer Cell* 19, 206–217.
- Mohrin, M., Bourke, E., Alexander, D., Warr, M.R., Barry-Holson, K., Le Beau, M.M., Morrison, C.G., and Passegué, E. (2010). Hematopoietic Stem Cell Quiescence Promotes Error-Prone DNA Repair and Mutagenesis. *Cell Stem Cell* 7, 174–185.
- Montgomery, C. (1990). Oncological and toxicological research□: Alleviation and control of pain and distress in laboratory animals. In *Cancer Bulletin*, pp. 230–237.
- Moorman, A.V., Chilton, L., Wilkinson, J., Ensor, H.M., Bown, N., and Proctor, S.J. (2010). A population-based cytogenetic study of adults with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 115, 206–214.
- Morisot, S., Wayne, A.S., Bohana-Kashtan, O., Kaplan, I.M., Gocke, C.D., Hildreth, R., Stetler-Stevenson, M., Walker, R.L., Davis, S., Meltzer, P.S., et al. (2010). High frequencies of leukemia stem cells in poor-outcome childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias. *Leukemia* 24, 1859–1866.
- Morrison, S.J., and Scadden, D.T. (2014). The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 505, 327–334.



## *Bibliographie*

Morrison, S.J., and Spradling, A.C. (2008). Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance throughout Life. *Cell* 132, 598–611.

Mortensen, M., Soilleux, E.J., Djordjevic, G., Tripp, R., Lutteropp, M., Sadighi-Akha, E., Stranks, A.J., Glanville, J., Knight, S., Jacobsen, S.-E.W., et al. (2011). The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. *J. Exp. Med.* 208, 455–467.

Mrózek, K., Harper, D.P., and Aplan, P.D. (2009). Cytogenetics and Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 23, 991–1010.

Mullighan, C.G., Phillips, L.A., Su, X., Ma, J., Miller, C.B., Shurtleff, S.A., and Downing, J.R. (2008). Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science* 322, 1377–1380.

Nagasawa, T. (2006). Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 107–116.

Narayanan, S., and Shami, P.J. (2012). Treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 81, 94–102.

Naumov, G.N., Akslen, L.A., and Folkman, J. (2006). Role of Angiogenesis in Human Tumor Dormancy: Animal Models of the Angiogenic Switch. *Cell Cycle* 5, 1779–1787.

Naveiras, O., Nardi, V., Wenzel, P.L., Hauschka, P.V., Fahey, F., and Daley, G.Q. (2009). Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* 460, 259–263.

Nombela-Arrieta, C., Pivarnik, G., Winkel, B., Canty, K.J., Harley, B., Mahoney, J.E., Park, S.-Y., Lu, J., Protopopov, A., and Silberstein, L.E. (2013). Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nat. Cell Biol.* 15, 533–543.

Notta, F., Doulatov, S., Laurenti, E., Poepl, A., Jurisica, I., and Dick, J.E. (2011). Isolation of Single Human Hematopoietic Stem Cells Capable of Long-Term Multilineage Engraftment. *Science* 333, 218–221.

O'Brien, C.A., Pollett, A., Gallinger, S., and Dick, J.E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445, 106–110.

O'Sullivan, T., Saddawi-Konefka, R., Vermi, W., Koebel, C.M., Arthur, C., White, J.M., Uppaluri, R., Andrews, D.M., Ngiow, S.F., Teng, M.W.L., et al. (2012). Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity. *J. Exp. Med.* 209, 1869–1882.

Okajima, E., and Thorgeirsson, U.P. (2000). Different Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression by the ERK and p38 Kinase Pathways in v-ras, v-raf, and v-myc Transformed Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270, 108–111.

Omatsu, Y., Sugiyama, T., Kohara, H., Kondoh, G., Fujii, N., Kohno, K., and Nagasawa, T. (2010). The Essential Functions of Adipo-osteogenic Progenitors as the Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Niche. *Immunity* 33, 387–399.

Van Os, R., de Haan, G., and Dykstra, B.J. (2009). Hematopoietic Stem Cell Quiescence: Yet Another Role for p53. *Cell Stem Cell* 4, 7–8.

Parmar, K., Mauch, P., Vergilio, J.-A., Sackstein, R., and Down, J.D. (2007). Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 5431–5436.

Preston, D.L., Kusumi, S., Tomonaga, M., Izumi, S., Ron, E., Kuramoto, A., Kamada, N., Dohy, H., Matsuo, T., and Matsui T [corrected to Matsuo, T.] (1994). Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat. Res.* 137, S68–97.

Pui, C.-H., and Evans, W.E. (2006). Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 354, 166–178.

Pui, C.-H., and Evans, W.E. (2013). A 50-Year Journey to Cure Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Semin. Hematol.* 50, 185–196.

Pui, C.-H., Campana, D., and Evans, W.E. (2001). Childhood acute lymphoblastic leukaemia – current status and future perspectives. *Lancet Oncol.* 2, 597–607.

Pui, C.-H., Relling, M.V., and Downing, J.R. (2004). Acute Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 350, 1535–1548.

Pui, C.-H., Carroll, W.L., Meshinchi, S., and Arceci, R.J. (2011). Biology, Risk Stratification, and Therapy of Pediatric Acute Leukemias: An Update. *J. Clin. Oncol.* 29, 551–565.

Pui, C.-H., Mullighan, C.G., Evans, W.E., and Relling, M.V. (2012). Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood* 120, 1165–1174.

Quesnel, B. (2013). Tumor Dormancy: Long-Term Survival in a Hostile Environment. In *Systems Biology of Tumor Dormancy*, H. Enderling, N. Almog, and L. Hlatky, eds. (Springer New York), pp. 181–200.

Quintana, E., Shackleton, M., Foster, H.R., Fullen, D.R., Sabel, M.S., Johnson, T.M., and Morrison, S.J. (2010). Phenotypic Heterogeneity among Tumorigenic Melanoma Cells from Patients that Is Reversible and Not Hierarchically Organized. *Cancer Cell* 18, 510–523.

Rabinovsky, R., Uhr, J.W., Vitetta, E.S., and Yefenof, E. (2007). Cancer Dormancy: Lessons from a B Cell Lymphoma and Adenocarcinoma of the Prostate. In *Advances in Cancer Research*, George F. Vande Woude and George Klein, ed. (Academic Press), pp. 189–202.

Rehe, K., Wilson, K., Bomken, S., Williamson, D., Irving, J., den Boer, M.L., Stanulla, M., Schrappe, M., Hall, A.G., Heidenreich, O., et al. (2013). Acute B lymphoblastic leukaemia-

## Bibliographie

propagating cells are present at high frequency in diverse lymphoblast populations. *EMBO Mol. Med.* 5, 38–51.

Rivera, G.K., Zhou, Y., Hancock, M.L., Gajjar, A., Rubnitz, J., Ribeiro, R.C., Sandlund, J.T., Hudson, M., Relling, M., Evans, W.E., et al. (2005). Bone marrow recurrence after initial intensive treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 103, 368–376.

Rosen, J.M., and Jordan, C.T. (2009). The Increasing Complexity of the Cancer Stem Cell Paradigm. *Science* 324, 1670–1673.

Rouault-Pierre, K., Lopez-Onieva, L., Foster, K., Anjos-Afonso, F., Lamrissi-Garcia, I., Serrano-Sanchez, M., Mitter, R., Ivanovic, Z., de Verneuil, H., Gribben, J., et al. (2013). HIF-2 $\alpha$  Protects Human Hematopoietic Stem/Progenitors and Acute Myeloid Leukemic Cells from Apoptosis Induced by Endoplasmic Reticulum Stress. *Cell Stem Cell* 13, 549–563.

Saito, Y., Uchida, N., Tanaka, S., Suzuki, N., Tomizawa-Murasawa, M., Sone, A., Najima, Y., Takagi, S., Aoki, Y., Wake, A., et al. (2010a). Induction of cell cycle entry eliminates human leukemia stem cells in a mouse model of AML. *Nat. Biotechnol.* 28, 275–280.

Saito, Y., Kitamura, H., Hijikata, A., Tomizawa-Murasawa, M., Tanaka, S., Takagi, S., Uchida, N., Suzuki, N., Sone, A., Najima, Y., et al. (2010b). Identification of Therapeutic Targets for Quiescent, Chemotherapy-Resistant Human Leukemia Stem Cells. *Sci. Transl. Med.* 2, 17ra9–17ra9.

Sarry, J.-E., Murphy, K., Perry, R., Sanchez, P.V., Secreto, A., Keefer, C., Swider, C.R., Strzelecki, A.-C., Cavalier, C., Récher, C., et al. (2011). Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2R $\gamma$ -deficient mice. *J. Clin. Invest.* 121, 384–395.

Schmidt, T., and Carmeliet, P. (2011). Angiogenesis: A Target in Solid Tumors, Also in Leukemia? *ASH Educ. Program Book 2011*, 1–8.

Schmitz, M., Breithaupt, P., Scheidegger, N., Cario, G., Bonapace, L., Meissner, B., Mirkowska, P., Tchinda, J., Niggli, F.K., Stanulla, M., et al. (2011). Xenografts of highly resistant leukemia recapitulate the clonal composition of the leukemogenic compartment. *Blood* 118, 1854–1864.

Schödel, J., Oikonomopoulos, S., Ragoussis, J., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., and Mole, D.R. (2011). High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood* 117, e207–e217.

Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4, 7–25.

Semenza, G.L. (2007). Life with Oxygen. *Science* 318, 62–64.

Siegel, R., Naishadham, D., and Jemal, A. (2013). Cancer statistics, 2013. *CA. Cancer J. Clin.* 63, 11–30.

- Simsek, T., Kocabas, F., Zheng, J., DeBerardinis, R.J., Mahmoud, A.I., Olson, E.N., Schneider, J.W., Zhang, C.C., and Sadek, H.A. (2010). The Distinct Metabolic Profile of Hematopoietic Stem Cells Reflects Their Location in a Hypoxic Niche. *Cell Stem Cell* 7, 380–390.
- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396–401.
- Sinnett, D., N'Diaye, N., St-Onge, P., and Healy, J. (2007). La leucémie de l'enfant: Une maladie génétique □! *Médecine/sciences* 23, 968–974.
- Sipkins, D.A., Wei, X., Wu, J.W., Runnels, J.M., Côté, D., Means, T.K., Luster, A.D., Scadden, D.T., and Lin, C.P. (2005). In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature* 435, 969–973.
- Sison, E.A.R., Rau, R.E., McIntyre, E., Li, L., Small, D., and Brown, P. (2013). MLL-rearranged acute lymphoblastic leukaemia stem cell interactions with bone marrow stroma promote survival and therapeutic resistance that can be overcome with CXCR4 antagonism. *Br. J. Haematol.* 160, 785–797.
- Somervaille, T.C.P., and Cleary, M.L. (2006). Identification and characterization of leukemia stem cells in murine MLL-AF9 acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 10, 257–268.
- Spencer, J.A., Ferraro, F., Roussakis, E., Klein, A., Wu, J., Runnels, J.M., Zaher, W., Mortensen, L.J., Alt, C., Turcotte, R., et al. (2014). Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature*.
- Stock, W. (2010). Adolescents and Young Adults with Acute Lymphoblastic Leukemia. *ASH Educ. Program Book 2010*, 21–29.
- Stuart, J.A., and Brown, M.F. (2006). Energy, quiescence and the cellular basis of animal life spans. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 143, 12–23.
- Suda, T., Takubo, K., and Semenza, G.L. (2011). Metabolic Regulation of Hematopoietic Stem Cells in the Hypoxic Niche. *Cell Stem Cell* 9, 298–310.
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., and Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches. *Immunity* 25, 977–988.
- Swerdlow, S., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., and Vardiman, J.W. (2008). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition - WHO - OMS -.
- Takubo, K., Goda, N., Yamada, W., Iriuchishima, H., Ikeda, E., Kubota, Y., Shima, H., Johnson, R.S., Hirao, A., Suematsu, M., et al. (2010). Regulation of the HIF-1 $\alpha$  Level Is Essential for Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 7, 391–402.

## Bibliographie

Takubo, K., Nagamatsu, G., Kobayashi, C.I., Nakamura-Ishizu, A., Kobayashi, H., Ikeda, E., Goda, N., Rahimi, Y., Johnson, R.S., Soga, T., et al. (2013). Regulation of Glycolysis by Pdk Functions as a Metabolic Checkpoint for Cell Cycle Quiescence in Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 12, 49–61.

Tanaka, T., Wiesener, M., Bernhardt, W., Eckardt, K., and Warnecke, C. (2009). The human *HIF* (hypoxia-inducible factor)-3 $\alpha$  gene is a HIF-1 target gene and may modulate hypoxic gene induction. *Biochem. J.* 424, 143–151.

Taniura, H., Kobayashi, M., and Yoshikawa, K. (2005). Functional domains of necdin for protein-protein interaction, nuclear matrix targeting, and cell growth suppression. *J. Cell. Biochem.* 94, 804–815.

Taussig, D.C., Vargaftig, J., Miraki-Moud, F., Griessinger, E., Sharrock, K., Luke, T., Lillington, D., Oakervee, H., Cavenagh, J., Agrawal, S.G., et al. (2010). Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34<sup>-</sup> fraction. *Blood* 115, 1976–1984.

Teachey, D.T., and Hunger, S.P. (2013). Predicting relapse risk in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 162, 606–620.

Teng, M.W.L., Swann, J.B., Koebel, C.M., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2008). Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J. Leukoc. Biol.* 84, 988–993.

Terpstra, W., Ploemacher, R.E., Prins, A., Lom, K. van, Pouwels, K., Wognum, A.W., Wagemaker, G., Lowenberg, B., and Wielenga, J.J. (1996). Fluorouracil selectively spares acute myeloid leukemia cells with long-term growth abilities in immunodeficient mice and in culture. *Blood* 88, 1944–1950.

Thomas, X. (2005). Emerging drugs for adult acute lymphoblastic leukaemia. *Expert Opin. Emerg. Drugs* 10, 591–617.

Thomas, X. (2009). Chemotherapy of acute leukemia in adults. *Expert Opin. Pharmacother.* 10, 221–237.

Thomas, X., Boiron, J.-M., Huguet, F., Dombret, H., Bradstock, K., Vey, N., Kovacsovics, T., Delannoy, A., Fegueux, N., Fenaux, P., et al. (2004). Outcome of Treatment in Adults With Acute Lymphoblastic Leukemia: Analysis of the LALA-94 Trial. *J. Clin. Oncol.* 22, 4075–4086.

Toren, A., Bielora, B., Jacob-Hirsch, J., Fisher, T., Kreiser, D., Moran, O., Zeligson, S., Givol, D., Yitzhaky, A., Itskovitz-Eldor, J., et al. (2005). CD133-Positive Hematopoietic Stem Cell “Stemness” Genes Contain Many Genes Mutated or Abnormally Expressed in Leukemia. *STEM CELLS* 23, 1142–1153.

Tothova, Z., Kollipara, R., Huntly, B.J., Lee, B.H., Castrillon, D.H., Cullen, D.E., McDowell, E.P., Lazo-Kallanian, S., Williams, I.R., Sears, C., et al. (2007). FoxOs Are Critical Mediators of Hematopoietic Stem Cell Resistance to Physiologic Oxidative Stress. *Cell* 128, 325–339.

- Trumpp, A., Essers, M., and Wilson, A. (2010). Awakening dormant haematopoietic stem cells. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 201–209.
- Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N.L., Beau, M.M.L., Hellström-Lindberg, E., Tefferi, A., et al. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* *114*, 937–951.
- Viatour, P., Somervaille, T.C., Venkatasubrahmanyam, S., Kogan, S., McLaughlin, M.E., Weissman, I.L., Butte, A.J., Passegué, E., and Sage, J. (2008). Hematopoietic Stem Cell Quiescence Is Maintained by Compound Contributions of the Retinoblastoma Gene Family. *Cell Stem Cell* *3*, 416–428.
- Le Viseur, C., Hotfilder, M., Bomken, S., Wilson, K., Röttgers, S., Schrauder, A., Rosemann, A., Irving, J., Stam, R.W., Shultz, L.D., et al. (2008). In Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia, Blasts at Different Stages of Immunophenotypic Maturation Have Stem Cell Properties. *Cancer Cell* *14*, 47–58.
- Vormoor, H.J. (2009). Malignant stem cells in childhood acute lymphoblastic leukemia: The stem cell concept revisited. *Cell Cycle* *8*, 996–999.
- Wang, Y., Liu, Y., Malek, S.N., Zheng, P., and Liu, Y. (2011). Targeting HIF1 $\alpha$  Eliminates Cancer Stem Cells in Hematological Malignancies. *Cell Stem Cell* *8*, 399–411.
- Van der Wath, R.C., Wilson, A., Laurenti, E., Trumpp, A., and Liò, P. (2009). Estimating Dormant and Active Hematopoietic Stem Cell Kinetics through Extensive Modeling of Bromodeoxyuridine Label-Retaining Cell Dynamics. *PLoS ONE* *4*, e6972.
- Weinhold, K.J., Miller, D.A., and Wheelock, E.F. (1979). The tumor dormant state. Comparison of L5178Y cells used to establish dormancy with those that emerge after its termination. *J. Exp. Med.* *149*, 745–757.
- Welschinger, R., Liedtke, F., Basnett, J., Dela Pena, A., Juarez, J.G., Bradstock, K.F., and Bendall, L.J. (2013). Plerixafor (AMD3100) induces prolonged mobilization of acute lymphoblastic leukemia cells and increases the proportion of cycling cells in the blood in mice. *Exp. Hematol.* *41*, 293–302.e1.
- Wicha, M.S. (2006). Cancer Stem Cells and Metastasis: Lethal Seeds. *Clin. Cancer Res.* *12*, 5606–5607.
- Wilson, A., Laurenti, E., Oser, G., van der Wath, R.C., Blanco-Bose, W., Jaworski, M., Offner, S., Dunant, C.F., Eshkind, L., Bockamp, E., et al. (2008). Hematopoietic Stem Cells Reversibly Switch from Dormancy to Self-Renewal during Homeostasis and Repair. *Cell* *135*, 1118–1129.
- Winkler, I.G., Barbier, V., Wadley, R., Zannettino, A.C.W., Williams, S., and Lévesque, J.-P. (2010). Positioning of bone marrow hematopoietic and stromal cells relative to blood flow in vivo: serially reconstituting hematopoietic stem cells reside in distinct nonperfused niches. *Blood* *116*, 375–385.

## Bibliographie

Xie, Y., Yin, T., Wiegraebe, W., He, X.C., Miller, D., Stark, D., Perko, K., Alexander, R., Schwartz, J., Grindley, J.C., et al. (2008). Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. *Nature* 457, 97–101.

Yamada, T., Park, C.S., and Lacorazza, H.D. (2013). Genetic control of quiescence in hematopoietic stem cells. *Cell Cycle* 12, 2376–2383.

Yamazaki, S., Ema, H., Karlsson, G., Yamaguchi, T., Miyoshi, H., Shioda, S., Taketo, M.M., Karlsson, S., Iwama, A., and Nakauchi, H. (2011). Nonmyelinating Schwann Cells Maintain Hematopoietic Stem Cell Hibernation in the Bone Marrow Niche. *Cell* 147, 1146–1158.

Yeoh, A.E.J., Tan, D., Li, C.-K., Hori, H., Tse, E., and Pui, C.-H. (2013). Management of adult and paediatric acute lymphoblastic leukaemia in Asia: resource-stratified guidelines from the Asian Oncology Summit 2013. *Lancet Oncol.* 14, e508–e523.

Yuan, Y., Shen, H., Franklin, D.S., Scadden, D.T., and Cheng, T. (2004). In vivo self-renewing divisions of haematopoietic stem cells are increased in the absence of the early G1-phase inhibitor, p18INK4C. *Nat. Cell Biol.* 6, 436–442.

Zeng, H., Yücel, R., Kosan, C., Klein-Hitpass, L., and Möröy, T. (2004). Transcription factor Gfi1 regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells. *EMBO J.* 23, 4116–4125.

Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.-G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J.Q., et al. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425, 836–841.

Zhang, J., Seet, C.S., Sun, C., Li, J., You, D., Volk, A., Breslin, P., Li, X., Wei, W., Qian, Z., et al. (2013). p27kip1 maintains a subset of leukemia stem cells in the quiescent state in murine MLL-leukemia. *Mol. Oncol.* 7, 1069–1082.

Zhou, S., Schuetz, J.D., Bunting, K.D., Colapietro, A.-M., Sampath, J., Morris, J.J., Lagutina, I., Grosveld, G.C., Osawa, M., Nakauchi, H., et al. (2001). The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat. Med.* 7, 1028–1034.

Zhu, J., Garrett, R., Jung, Y., Zhang, Y., Kim, N., Wang, J., Joe, G.J., Hexner, E., Choi, Y., Taichman, R.S., et al. (2007). Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells. *Blood* 109, 3706–3712.

Zou, P., Yoshihara, H., Hosokawa, K., Tai, I., Shinmyozu, K., Tsukahara, F., Maru, Y., Nakayama, K., Nakayama, K.I., and Suda, T. (2011). p57Kip2 and p27Kip1 Cooperate to Maintain Hematopoietic Stem Cell Quiescence through Interactions with Hsc70. *Cell Stem Cell* 9, 247–261.

# **Annexe**





## 9 Annexes : Contribution aux publications du laboratoire

OPEN ACCESS Freely available online



### Busulfan Administration Flexibility Increases the Applicability of Scid Repopulating Cell Assay in NSG Mouse Model

Jean Chevalyre<sup>1,2,3</sup>, Pascale Duchez<sup>1,2,3</sup>, Laura Rodriguez<sup>1,2,3</sup>, Marija Vlaski<sup>1,2,3</sup>, Arnaud Villacreces<sup>2,3</sup>, Véronique Conrad-Lapostolle<sup>2,3</sup>, Vincent Praloran<sup>2,3</sup>, Zoran Ivanovic<sup>1,2,3</sup>, Philippe Brunet de la Grange<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Etablissement Français du Sang – Aquitaine Limousin (EFS-AqLi), Bordeaux, France, <sup>2</sup> CNRS (UMR 5164), Bordeaux, France, <sup>3</sup> Université Bordeaux Segalen (UMR 5164), Bordeaux, France

#### Abstract

**Background:** Xenotransplantation models allowing the identification and quantification of human Hematopoietic stem cells (HSC) in immunodeficient mice remain the only way to appropriately address human HSC function despite the recent progress in phenotypic characterization. However, these *in vivo* experiments are technically demanding, time consuming and expensive. Indeed, HSCs engraftment in mouse requires pre-conditioning of animals either by irradiation or cytotoxic drugs to allow homing of injected cells in specific stem cell niches and their subsequent expansion and differentiation in bone marrow. Recently, the development of busulfan pre-conditioning of animals improved the flexibility of experimentation in comparison with irradiation.

**Design and Methods:** In order to further facilitate the organization of these complex experiments we investigated the effect of extending the period between mice pre-conditioning and cell injection on the engraftment efficiency. In the meantime, we also explored the role of busulfan doses, mouse gender and intravenous injection route (caudal or retro orbital) on engraftment efficiency.

**Results and Conclusion:** We showed that a period of up to 7 days did not modify engraftment efficiency of human HSCs in NSG model. Moreover, retro orbital cell injection to female mice pre-conditioned with 2x25 mg/kg of busulfan seems to be the best adapted schema to detect the human HSC in xenotransplantation experiments.

### Discarded leukoreduction filters: A new source of stem cells for research, cell engineering and therapy?



Yann Peytour<sup>a,b,c</sup>, Arnaud Villacreces<sup>a,b</sup>, Jean Chevalyre<sup>b,c</sup>, Zoran Ivanovic<sup>b,c</sup>, Vincent Praloran<sup>a,b,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Univ. Bordeaux, CIRID, UMR 5164, F-33000 Bordeaux, France

<sup>b</sup> CNRS, CIRID, UMR 5164, F-33000 Bordeaux, France

<sup>c</sup> Etablissement Français du Sang Aquitaine-Limousin, 33035 Bordeaux, France

<sup>d</sup> Laboratoire d'Hématologie, CHU of Bordeaux, France

Received 28 November 2012; received in revised form 11 April 2013; accepted 4 May 2013

Available online 11 May 2013

**Abstract** New adult stem cell sources, devoid of the technical/ethical/economical barriers of those presently available, would favor the ongoing development of *in vitro* cell engineering and transplantation.

Hematopoietic transplantation opened the way to and remains the most successful cell transplantation procedure. CD34+ cells that include hematopoietic stem cells (HSCs) and hematopoietic progenitors (HPs) are presently harvested from bone marrow (BM), cord blood or peripheral blood (after being mobilized from BM). The panel of potential donors, the quantities of collected cells and some other technical/medical problems still represent limiting factors to their transplantation in some patients. Steady state peripheral blood (SSPB) contains very low frequencies of CD34+ cells. They are trapped in leukoreduction filters (LRFs), which are discarded after the preparation of therapeutic red blood cell concentrates from individual blood donations. We recently developed a procedure allowing the easy and rapid elution of CD34+ cells from LRFs and we showed that they are functionally similar to those harvested from other sources.

After providing an overview of the sources, interests and limitations of therapeutic HSCs presently available, we will provide arguments based on our and others' results suggesting that SSPB could become an attractive source of HSCs for hematopoietic transplantation and of other cell types for various research/development procedures.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## Very low oxygen concentration (0.1%) reveals two FDCP-Mix cell subpopulations that differ by their cell cycling, differentiation and p27<sup>KIP1</sup> expression

AV Guitart<sup>1,2,3,6</sup>, C Debeissat<sup>1,2,3,6</sup>, F Hermitte<sup>1,2,3,7</sup>, A Villacreces<sup>1,2,3</sup>, Z Ivanovic<sup>4</sup>, H Boeuf<sup>1,2,3</sup> and V Praloran<sup>\*1,2,3,5</sup>

Oxygen (O<sub>2</sub>) concentrations in bone marrow vary from 4% in capillaries to <0.1% in subendosteum, in which hematopoietic stem cells reside in specific niches. Culture at low O<sub>2</sub> concentrations (3, 1 and 0.1%) influences hematopoietic stem and progenitor cells survival, proliferation and differentiation, depending on their level of differentiation. Culture of human CD34<sup>+</sup> cells at low O<sub>2</sub> concentrations (O<sub>2</sub> ≤ 3%) maintains stem cell engraftment potential better than at 20% O<sub>2</sub> (NOD/Scid xenograft model). In contrast, progenitors disappear from cultures at/or <1% O<sub>2</sub> concentrations. A very low O<sub>2</sub> concentration (0.1%) induces CD34<sup>+</sup> quiescence in G<sub>0</sub>. The exploration of molecules and mechanisms involved in hematopoietic stem and progenitor cells' quiescence and differentiation related to low O<sub>2</sub> concentrations is unfeasible with primary CD34<sup>+</sup> cells. Therefore, we performed it using murine hematopoietic nonleukemic factor-dependent cell Paterson (FDCP)-Mix progenitor cell line. The culture of the FDCP-Mix line at 0.1% O<sub>2</sub> induced in parallel G<sub>0</sub> quiescence and granulo-monocytic differentiation of most cells, whereas a minority of undifferentiated self-renewing cells remained in active cell cycle. Hypoxia also induced hypophosphorylation of pRb and increased the expression of p27<sup>KIP1</sup>, the two proteins that have a major role in the control of G<sub>0</sub> and G<sub>1</sub> to S-phase transition.

*Cell Death and Differentiation* (2011) 18, 174–182; doi:10.1038/cdd.2010.85; published online 30 July 2010

*Transfusion*, 2010 Oct;50(10):2152-7. doi: 10.1111/j.1537-2995.2010.02683.x. Epub 2010 Oct 4.

### Obtaining of CD34+ cells from healthy blood donors: development of a rapid and efficient procedure using leukoreduction filters.

Pevtour Y<sup>1</sup>, Guitart A, Villacreces A, Chevalere J, Lacombe F, Ivanovic Z, Praloran V.

#### ⊕ Author information

#### Abstract

**BACKGROUND:** Human CD34+ cells are mandatory to study many aspects of human hematopoiesis. Their low frequency in blood or marrow and ethical reasons limit their obtainment in large quantities. Leukoreduction filters (LRFs) are discarded after preparation of red blood cells. The CD34+ cell concentration in healthy donor blood is low (1×10<sup>3</sup>–4×10<sup>3</sup> /mL), but their number trapped in one LRF after filtration of 400 to 450mL of blood is high (0.4×10<sup>6</sup>–1.6×10<sup>6</sup>).

**STUDY DESIGN AND METHODS:** To develop a procedure allowing obtainment of purified CD34+ cells from LRFs with a good yield, white blood cell (WBC) recoveries after a 500-mL continuous or after sequential elution (50- or 20-mL fractions) were compared. Different WBC and mononuclear cell (MNC) centrifugation methods were tested to minimize their PLT contamination before the CD34+ cell immunomagnetic selection. Cell functionality was finally analyzed under various culture conditions.

**RESULTS:** The 20-mL back-flushing of LRFs allowed the most efficient WBC recovery. The next steps (110×g centrifugation, MNC separation on Ficoll, and washes) resulted in a cell suspension in which the lymphocyte recovery was approximately 76±10% and the PLT contamination below 1.6%. After immunomagnetic selection, 4×10<sup>5</sup> to 6×10<sup>5</sup> cells containing approximately 85% of functional CD34+ cells were obtained.

**CONCLUSION:** This procedure allows the easy, rapid (<5hr), and efficient preparation of large quantities of CD34+ cells having functional activities similar to those of CD34+ cells from other sources. Therefore, easily available and virally safe, LRFs represent an important and regular WBC source to work with human CD34+ cells, but also with other WBC types.

© 2010 American Association of Blood Banks.