



HAL
open science

Rôle de Tif1gamma dans les différenciations granulo-monocytaire et macrophagique

Marie-Lorraine Chretien

► **To cite this version:**

Marie-Lorraine Chretien. Rôle de Tif1gamma dans les différenciations granulo-monocytaire et macrophagique. Médecine humaine et pathologie. Université de Bourgogne, 2015. Français. NNT : 2015DIJOS060 . tel-01289273

HAL Id: tel-01289273

<https://theses.hal.science/tel-01289273>

Submitted on 16 Mar 2016

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.



ÉCOLE DOCTORALE
PRES | Bourgogne | Franche-Comté
Environnements - Santé

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

ÉCOLE DOCTORALE : ENVIRONNEMENT-SANTE

THESE

Pour obtenir le grade de **DOCTEUR**

Discipline : Sciences de la Vie

Spécialité : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement le 18 Décembre 2015

Par

Marie-Lorraine CHRETIEN

**ROLE DE Tif1 γ DANS LES DIFFERENCIATIONS GRANULO-
MONOCYTAIRE ET MACROPHAGIQUE**

Centre de Recherche Inserm UMR 866 de Dijon

Jury

Professeur François GIRODON	Président
Docteur Véronique MAGUER-SATTA	Rapporteur
Professeur Didier BOUSCARY	Rapporteur
Docteur Sandrine SARRAZIN	Examinatrice
Professeur Jean-Noël BASTIE	Examineur
Professeur Eric SOLARY	Examineur
Docteur Laurent DELVA	Directeur

Les sciences sont des lunettes pour grossir les problèmes (Louis Scutenaire)

Remerciements

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury :

Madame Véronique MAGER-SATTA et Monsieur Didier BOUSCARY d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Je vous remercie pour vos conseils et recommandations.

Madame Sandrine SARRAZIN et Monsieur Eric SOLARY, respectivement marraine et parrain de thèse. Vous m'avez guidée durant ces quatre années et je vous remercie de votre écoute, votre disponibilité et vos conseils. Vous avez accepté de juger ce travail en tant qu'examinateur et je vous en suis reconnaissante.

Messieurs Laurent DELVA et Jean-Noël BASTIE, respectivement directeur et co-directeur de ce travail. Merci pour votre patience en toutes circonstances. Laurent, mille mercis pour ton aide précieuse dans l'écriture de l'article et de ce manuscrit.

Je tiens également à remercier l'ensemble de l'équipe actuelle et « les anciens » qui m'ont souvent soutenue et aidée. Romain 1, devenu canadien depuis quelques années qui m'a formée à la science. Ta rigueur a renforcé la mienne et j'aurai plaisir à travailler à nouveau à tes côtés. Briçounet, Anne et Romain 2 avec qui j'ai eu grand plaisir à travailler également. Je vous souhaite une grande réussite. Ronan qui m'a remplacée dans la gestion du modèle murin et qui m'a apporté son expérience et ses conseils à plusieurs reprises. Laetitia, Jennifer et Anne qui assurent la relève et à qui je dis bon courage car il en faut. Merci pour votre gentillesse. Valérie que j'ai le plaisir de connaître de mieux en mieux. Merci pour nos conversations à la paillassse dans les moments de découragement, et pour nos soirées toujours sous le signe du rire. Je te souhaite le meilleur. Je n'oublie pas Arthur, déraciné à Boston, Jean parti chez nos amis teutons. Nos trails me laissent d'excellents souvenirs, surtout en V.T.T que j'ai abandonné depuis ! Malika, merci pour tes précieux conseils. Je te souhaite bon courage pour ta carrière de médecin. Sans omettre ma chère Arlette avec qui il est si agréable de converser tout en étant des plus efficaces à la plateforme de cytométrie. Merci pour ton aide inestimable. Enfin, merci à tous les autres membres de l'unité qui m'ont également souvent apporté conseils et aide : Cindy, Catherine, Sabrina, Aymeric, Marion, Hélène, Kevin, Olivier.

Un immense merci à toute l'équipe d'hématologie clinique sans qui ce travail n'aurait pu voir le jour. Votre patience et votre soutien sont inestimables. Manu, merci pour ton écoute et l'intérêt que tu as porté à ce projet. Caro, merci pour le travail accompli pendant ton master qui m'a bien aiguillé. Denis pour supporter mes « coups de gueule », Ingrid, Camille, Olivier, Nuhri et les internes pour assurer le travail clinique pendant mon absence.

Merci infiniment à ma famille qui a été autant soulagée que moi quand ce travail fut conclu. Papa, maman, les mots me manquent. Nicolas, Ombeline, Alexandre et vos moitiés. Vous m'êtes tous si chers. Je n'oublie pas Mamie Georgette, fidèle mamie toujours aussi vaillante et exceptionnelle. Mes cousins, cousines, oncles, tantes, marraine, vous êtes également dans mes pensées.

Merci à mes amies d'enfance, Claire et Anne-Lise. Votre amitié m'est viscéralement nécessaire. A Clémence, à Prisca, toujours aussi présentes et fidèles malgré les difficultés.

Merci à mon fidèle groupe d'amis qui depuis un an a fait de la solitude un vieux souvenir grâce à nos dîners, nos soirées, nos fous rires. Marion, Antoine, Fabienne, Romaric, Valérie. Nos traditions doivent impérativement se perpétuer. J'ai évité le prozac grâce à tes œufs Kinder® Romaric !

Enfin, Cyril. Merci infiniment pour ton inconditionnel soutien et ton amour. Tu as toujours su me remotiver et trouver les mots pour m'encourager et cela a porté ses fruits. Je t'en suis reconnaissante et je t'aime. Je n'oublie pas ta famille. Roger-Pierre, Sylvie, Aurore, Manu, Nadine, Cathie, Jean-Louis, Thérèse et les loustics Louison et Elliott. Vous m'avez accueillie à bras ouverts, vous souciant régulièrement de mon travail de thèse. Cela m'a beaucoup touchée et je vous en remercie.

Résumé

La LMMC est une pathologie clonale de la cellule souche hématopoïétique dont les caractéristiques la classent parmi les syndromes myélodysplasiques/myéloprolifératifs (SMD/SMP). L'inactivation conditionnelle de *Tiflγ* au niveau hématopoïétique chez la Souris (*Tiflγ^{Δ/Δ}*) est responsable du développement d'un SMD/SMP mimant la LMMC humaine lorsque la souris atteint l'âge de 6 mois, faisant de *Tiflγ* un gène suppresseur de tumeur. Par ailleurs, malgré une monocytose, la population macrophagique péritonéale de ces souris est diminuée.

Les objectifs de mon travail étaient de caractériser chez les souris malades la population myéloïde et d'étudier la différenciation macrophagique. Nous avons identifié chez les souris homozygotes *Tiflγ^{Δ/Δ}* une population morphologiquement immature, associant des caractéristiques granulocytaires et monocytaires. Les propriétés phénotypiques et moléculaires de cette population évoquent celles des cellules myéloïdes suppressives granulocytaires de type PMN-MDSC, faisant de *Tiflγ* un régulateur négatif de son développement. En sus, la différenciation *in vitro* des cellules myéloïdes médullaires en macrophages sous l'effet du CSF-1 est altérée. La baisse d'expression du CSF-1R n'explique pas à elle seule ces altérations puisque celle des cellules dendritiques est également perturbée sans modification de l'expression du GM-CSFR. Nous émettons l'hypothèse que l'augmentation d'expression de *S100A8* et *S100A9* chez les souris malades induit le développement des progéniteurs myéloïdes en cellules proches des PMN-MDSC au détriment des différenciations dendritique et macrophagique. En conclusion, *Tiflγ* est un régulateur majeur de la myélopoïèse.

Mots-clefs : *Tiflγ*, cellules myéloïdes suppressives, leucémie myélomonocytaire chronique, myélopoïèse

Summary

Chronic myelomonocytic leukemia (CMML) is a hematologic stem cell disease whose characteristics correspond to myelodysplastic/myeloproliferative syndroms (MDS/MPS). Hematopoietic conditional deletion of *Tif1 γ* in mice leads to the development of a MDS/MPS, mimicking human CMML, when age is comprised between 6 to 10 months, defining *Tif1 γ* as a tumour suppressor gene. Moreover, peritoneal macrophage population in these mice is decreased despite a monocytosis.

The aims of my work were first to characterize in sick mice the myeloid population, and second to study macrophage differentiation. The myeloid population in *Tif1 $\gamma^{\Delta\Delta}$* mice is morphologically immature, with granulocytic and monocytic features. We demonstrated that phenotypic and molecular characteristics of this population are close to those observed in PMN-MDSC (*polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells*), suggesting that *Tif1 γ* is a negative regulator gene of this myeloid subset. Furthermore, we showed that *in vitro* macrophage differentiation of myeloid progenitors upon CSF-1 treatment is altered. Decreased expression of CSF1-R (CSF-1 receptor) does not totally explain this alteration since dendritic cell differentiation is also abnormal, without alteration in GM-CSFR expression. Therefore, we hypothesize that *S100A8* and *S100A9* hyperexpression in *Tif1 $\gamma^{\Delta\Delta}$* mice is able to promote PMN-MDSC-like differentiation at the expense of macrophage and dendritic differentiations. In conclusion, *Tif1 γ* is a major myelopoiesis regulator gene.

Key words: *Tif1 γ* , myeloid-derived suppressor cells, chronic myelomonocytic leukemia, myelopoiesis

Liste des abréviations

AA	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien
ALC1	<i>Amplifier in liver cancer 1</i>
AMM	Autorisation de mise sur le marché
APC/C	<i>Anaphase promoting complex/cyclosome</i>
ARN	Acide ribonucléique
ASXL1	<i>Additional sex comb like 1</i>
ATRA	<i>All trans retinoic acid</i>
BCR/ABL	<i>Breakpoint cluster region/Abelson</i>
BFU	<i>Burst forming unit</i>
BMP4	<i>Bone morphogenic protein 4</i>
Bzip	<i>Basic region/leucine zipper</i>
CBL	<i>Casitas B lymphoma</i>
CCL	<i>Chemokine ligand</i>
CCR	Cancer colorectal
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDP	<i>Common dendritic cell precursor</i>
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>
<i>C-fms</i>	<i>Cellular-feline McDonough sarcoma</i>
CFU	<i>Colony forming unit</i>
CFU-GEMM	<i>Colony forming-unit granulocyte, erythrocyte, monocyte, megakaryocyte</i>
CFU-S	<i>Colony forming-unit in the spleen</i>
CHC	Carcinome hépatocellulaire
CLP	<i>Common lymphoid progenitor</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMoP	<i>Common monocyte progenitor</i>
CMP	<i>Common myeloid progenitor</i>
CO	Monoxyde de carbone

COX2	Cyclooxygénase 2
CPA	Cellule présentatrice de l'antigène
Cre-LoxP	<i>Cyclization recombinase-Locus of cross over in P1</i>
CSF-1	<i>Colony stimulating factor-1</i>
CPSS	<i>CMML-specific prognostic scoring system</i>
CSH	Cellule souche hématopoïétique
DHT	Dihydrotestostérone
DHX33	<i>DEAH box polypeptide 33</i>
DM	Dermatomyosite
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNMT3a	<i>DNa(cytosine 5)-methyltransferase 3a</i>
EGR	<i>Early growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMT	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>
eNOS	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i>
EPO	Erythropoïétine
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ETS	<i>E twenty six</i>
EZH2	Histone-lysine N-méthyltransférase
FAB	<i>French american british classification</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FGFR1	<i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>
FIRE	<i>C-fms intronic regulatory element</i>
FLT3	<i>Fms like tyrosine kinase 3</i>
GFI-1	<i>Growth factor independent-1</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>
GMP	<i>Granulocyte-monocyte progenitor</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HOX	<i>Homeobox gene</i>

HP1	<i>Heterochromatin protein 1</i>
HSC	<i>Hematopoietic stem cell</i>
Hsp	<i>Heat shock protein</i>
ICSBP	<i>Interferon consensus sequence-binding protein</i>
IDH	<i>Isocitrate déshydrogénase</i>
IFN	<i>Interféron</i>
IL	<i>Interleukine</i>
iMC	<i>Immature myeloid cells</i>
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
IPSS	<i>International prognostic scoring system</i>
IRF8	<i>Interferon regulatory factor 8</i>
IT-HSC	<i>Intermediate term-HSC</i>
JAK	<i>Janus kinase</i>
KLF4	<i>Krüppel like factor 4</i>
KRAB	<i>Krüppel-associated box</i>
LAM	<i>Leucémie aiguë myéloblastique</i>
LMC	<i>Leucémie myéloïde chronique</i>
LMMC	<i>Leucémie myélomonocytaire chronique</i>
LMMj	<i>Leucémie myélomonocytaire juvenile</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
LT	<i>Lymphocyte T</i>
LT-HSC	<i>Long term- HSC</i>
MAF B	<i>Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
M-CSF	<i>Monocyte colony stimulating factor</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein 1</i>
MDP	<i>Macrophage-dendritic cell progenitor</i>
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cell</i>
MEP	<i>Megakaryocyte-erythrocyte progenitor</i>

MGH	Maladie du greffon contre l'hôte
MGG	<i>May-Grünwald Giemsa</i>
MIP-2	<i>Macrophage inflammatory protein-2</i>
MMP-9	Matrix métallopeptidase 9
MPP	<i>Multipotent progenitor</i>
NF κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NKG2D	<i>Natural killer group 2 member D</i>
NLRP3	<i>Nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing pyrin domain containing 3</i>
NMuMG	<i>Normal murine mammary gland</i>
NO	Monoxyde d'azote
NOX2	NADPH oxydase 2
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor</i>
OMS	Organisation mondiale de la santé
PARP	PolyADPribose polymerase
Pb	Paire de base
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
PGE2	Prostaglandine E2
PHD	<i>Plant homeodomain</i>
PI3K/AKT/mTOR	<i>Phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B/ mammalian target of rapamycin</i>
PML/RAR α	<i>Promyelocytic leukaemia/Retinoic acid receptor alpha</i>
PMN	<i>Polymorphonuclear</i>
PNN	Polynucléaire neutrophile
PPAR γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PTC7	<i>Phosphate type two C7</i>

PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
Rag1	<i>Recombinase activating gene 1</i>
RAR	<i>Retinoic acid receptor</i>
RAS/RAF	<i>Rat sarcoma/Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RBCC	<i>Ring B-box coiled-coil</i>
RFG7	<i>RET-fused gene 7</i>
RING	<i>Really interesting gene</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
R-Smad	<i>Receptor-regulated Smad</i>
RUNX1	<i>Runt-related transcription factor 1</i>
SCF	<i>Stem cell factor</i>
Scf/Tal1	<i>Stem cell leukaemia/T-cell acute lymphocytic leukaemia</i>
SDF1	<i>Stromal cell-derived factor-1</i>
SF3B1	<i>Splicing Factor 3B1</i>
SG	<i>Survie globale</i>
SHIP	<i>SH2 domain containing-5-inositol phosphatase</i>
Smad	<i>Mothers against decapentaplegic homolog</i>
SMD	<i>Syndrome myélodysplasique</i>
SMP	<i>Syndrome myéloprolifératif</i>
SnoN	<i>Ski-related novel</i>
SPI-1/PU.1	<i>SSVF Provirus integration-1/Purine box binding protein 1</i>
SRSF2	<i>Serine/arginine-rich splicing factor 2</i>
ST-HSC	<i>Short term-HSC</i>
SUMO	<i>Small-ubiquitin-like modifier</i>
TAM	<i>Tumor associated macrophage</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TEM	<i>Transition épithelio-mésenchymateuse</i>
TEM	<i>TIE2-expressing monocyte/macrophage</i>
TET2	<i>Ten eleven translocation 2</i>

TGF β	<i>Transforming growth factor</i>
TIF	<i>Transcription intermediary factor</i>
Tip-DC	<i>TNF/iNOS producing dendritic cell</i>
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNF α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TNFAIP3	<i>Tumor necrosis factor alpha –induced protein 3</i>
TP53	<i>Tumor protein 53</i>
TPA	Phorbol ester 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate
TRIM	<i>Tripartite motif containing</i>
TSH	<i>Thyreostimulating hormon</i>
TSS	<i>TIF1 signature sequence</i>
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
VDR	<i>Vitamin D3 receptor</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

Liste des figures et tableaux

- Figure 1 :** Diversité de la famille TRIM (d'après Hatakeyama *et al.*, Nature Reviews., 2011)
- Figure 2 :** Représentation schématique du gène (A), de l'ARNm (B) et de la protéine TIF1 γ humaine (C) (Référence : <http://www.sudoc.fr/15264282X>)
- Figure 3 :** Structure cristallographique de la protéine TIF1 γ humaine (Référence : <http://cansar.icr.ac.uk/cancer/molecular-targets/Q9UPN9>)
- Figure 4 :** Représentation schématique du gène *Tif1 γ* murin (A et B). Correspondance entre les exons et les domaines conservés de la protéine Tif1 γ murine (B) (Yan *et al.*, Gene, 2004)
- Figure 5a :** Théorie proposée par Stefano Piccolo : TIF1 γ ubiquitinye Smad4 ainsi exportée dans le cytoplasme où Smad4 peut être désubiquitinylée par FAM/UPS9x afin d'être recyclée (d'après Dupont *et al.*, Cell, 2009)
- Figure 5b :** Théorie proposée par Joan Massagué : TIF1 γ interagit avec Smad2/3P en compétition avec Smad4 (adapté de He *et al.*, Cell, 2006)
- Figure 6 :** La CSH au sein de la niche hématopoïétique médullaire (d'après Orkin *et al.*, Cell, 2008)
- Figure 7 :** Modèle de la hiérarchie hématopoïétique selon Weissman (d'après Reya *et al.*, Nature, 2001)
- Figure 8 :** *Moonshine* est essentiel à l'érythropoïèse embryonnaire du Poisson-Zèbre (adapté de Ransom *et al.*, PLoS Biol., 2004)
- Figure 9 :** Représentation schématique des différents rôles de Tif1 γ au cours de l'hématopoïèse et plus spécifiquement au cours de l'érythropoïèse
- Figure 10 :** Monocyte sanguin, Coloration au MGG (May-Grünwald Giemsa)
- Figure 11 :** La différenciation des monocytes à partir des progéniteurs hématopoïétiques médullaires chez la Souris (adapté de Zimmermann *et al.*, Front Physiol., 2012)
- Figure 12 :** Les trois populations de monocytes chez l'Homme selon l'expression de CD14 et CD16 (adapté de Zimmermann *et al.*, Front Physiol., 2012)
- Figure 13 :** Les deux populations de monocytes chez la Souris, selon le niveau d'expression de Ly6C (adapté de Zimmermann *et al.*, Front Physiol., 2012)
- Figure 14 :** Les différentes populations macrophagiques et leurs origines (adapté de Wynn *et al.*, Nature, 2013)
- Figure 15a :** Représentation schématique du rôle suppresseur tumeur de *TIF1 γ* chez l'Homme

Figure 15b : TIF1 γ intervient aussi au cours des néoplasies mammaires

Figure 16 : Modèles hypothétiques de l'origine cellulaire des MDSC. A gauche, les MDSC sont issues d'un progéniteur immature. A droite, elles proviennent de la différenciation d'un granulocyte mature (adapté de Brandau *et al.*, Seminars in Cancer Biology, 2013).

Figure 17 : Régulation du promoteur d'*arginase-1* (Pourcet and Pineda-Torra 2013)

Figure 18 : Les MDSC inhibent la réponse immune anti-tumorale. Les MDSC séquestrent des acides aminés essentiels aux LT (arginine et cystéine) entraînant la diminution de leur prolifération (A). Elles sécrètent du NO, inhibent la migration de LT *via* le clivage de CD62L par la métallopeptidase ADAM17 (B), sécrètent des cytokines qui induisent les LT Th17 (IL-6, IL-23, TGF β) (C) ainsi que les Treg (IL-10, TGF β) (D), induisent la polarisation des macrophages M2 (IL-10, TGF β) (D), inhibent les cellules NK (TGF β) (E) (adapté de Botta *et al.*, Front. Oncol., 2014).

Figure 19 : Représentation schématique des conséquences de la perte d'expression de Tif1 γ sur les différenciations granulocytaire et monocyttaire.

L'expansion des GMP se traduit par celle d'une population myéloïde de morphologie immature dont le phénotype et la signature moléculaire évoquent ceux des PMN-MDSC. Leur fonctionnalité immunosuppressive n'est cependant pas retrouvée.

Parallèlement, la différenciation monocyto-macrophagique est altérée tant dans ses aspects quantitatif que qualitatif.

Figure 20 : Représentation schématique des conséquences de la perte d'expression de Tif1 γ sur l'expression de différents gènes et leur implication dans les différenciations.

La baisse d'expression de Tif1 γ entraîne une diminution de celle du CD115 se traduisant par une altération de la différenciation des macrophages. Celle-ci peut également s'expliquer par l'augmentation du niveau de *S100A8* et *S100A9* dont l'hyperexpression détourne la différenciation normale des GMP vers des cellules myéloïdes immatures de type « PMN-MDSC-like » au détriment des différenciations des voies macrophagique et dendritique.

Tableau 1 : Altération des gènes et protéines TRIM au cours des néoplasies

Tableau 2 : Synthèse des différents rôles tenus par Tif1 γ , dépendant ou non de son activité E3 Ubiquitine ligase

Tableau 3 : Les différentes populations de monocytes chez l'Homme et la Souris

Table des matières

Résumé	v
Summary	vi
Liste des abréviations	vii
Liste des figures et tableaux	xiii

Introduction	1
I. La superfamille TRIM et la famille TIF1	2
A. <u>Structure des protéines TRIM</u>	2
B. <u>Rôle des protéines TRIM au cours des processus néoplasiques</u>	3
C. <u>La famille TIF1</u>	6
1. TIF1 α	6
2. TIF1 β	7
3. TIF1 δ	7
4. TIF1 γ	8
a. Généralités	8
b. TIF1 γ est essentielle au développement embryonnaire	10
c. Rôles de TIF1 γ à l'échelle moléculaire	10
d. Rôle de TIF1 γ au cours du vieillissement	16
e. Rôle de TIF1 γ au cours de l'hématopoïèse normale	17
II. Les monocytes et leur différenciation	24
A. <u>Le monocyte</u>	24
B. <u>La monocytopoïèse</u>	25
1. Les cytokines ou facteurs de croissance	26
2. Les facteurs de transcription	26
a. SPI-1/PU.1	26
b. IRF8	27
c. KLF4	27
d. MAFB et c-MAF	27

3.	Coopération entre les facteurs de transcription et les voies de signalisation cytokinique	28
4.	Le rôle de la vitamine D3 et de son récepteur	29
C.	<u>L'hétérogénéité des monocytes</u>	30
1.	Chez l'Homme	30
a.	Les différentes populations monocytaires humaines	30
b.	Leurs rôles en pathologie humaine	32
2.	Chez la Souris	32
a.	Les monocytes CD115 ⁺ Ly6C ⁺	33
b.	Les monocytes CD115 ⁺ Ly6C ⁻	34
III.	Les macrophages	36
A.	<u>L'origine des macrophages</u>	36
B.	<u>Les différentes populations macrophagiques</u>	37
C.	<u>Les fonctions macrophagiques</u>	38
1.	Généralités	38
2.	La phagocytose assurée par les macrophages garantit l'homéostasie cellulaire	39
3.	Les macrophages participent à l'angiogenèse	39
4.	Les macrophages influencent le développement cérébral	39
5.	Les macrophages interviennent dans l'homéostasie métabolique	39
6.	Le rôle des macrophages dans la niche hématopoïétique	40
7.	Les macrophages au cours de l'érythropoïèse	41
8.	Les macrophages au cours de l'oncogenèse	41
9.	Les macrophages et les maladies auto-immunes	43
D.	<u>La différenciation macrophagique</u>	43
1.	Le CSF-1 et son récepteur, le CSF-1R	43
2.	Les facteurs de transcription	44
a.	Spi-1/PU.1	44
b.	KLF4	45
c.	MAFB	45
d.	c-MAF	46
e.	IRF8	47
f.	C/EBPβ	47
g.	EGR1 et EGR2	48

3.	Rôle des microARN	49
4.	Rôle des PPAR γ	49
5.	Rôle de <i>Tif1γ</i> au cours de la différenciation macrophagique	50
IV.	Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC)	50
V.	Rôles de <i>Tif1γ</i> en contexte pathologique	50
A.	<u>Rôle de <i>TIF1γ</i> au cours des maladies inflammatoires</u>	51
B.	<u><i>TIF1γ</i> : un oncogène</u>	51
C.	<u><i>TIF1γ</i> : un gène suppresseur de tumeur</u>	
1.	Son rôle au cours des néoplasies solides	51
2.	Son rôle au cours de l'hématopoïèse pathologique : développement d'une leucémie myélomonocytaire chronique	53
D.	<u>Rôle de <i>TIF1γ</i> au cours de la LMMC humaine</u>	54
1.	La LMMC	54
a.	Définition	54
b.	Epidémiologie	56
c.	Présentation clinique	56
d.	Physiopathologie	57
e.	Anomalies cytogénétiques et moléculaires	58
f.	Rôle des miARN au cours de la LMMC	59
g.	Facteurs pronostiques	60
h.	Prise en charge thérapeutique	61
VI.	Objectifs	62
A.	<u>Etudier le rôle de <i>Tif1γ</i> au cours de la myélopoïèse des souris <i>Tif1γ^{$\Delta\Delta$}</i></u>	62
B.	<u>Etudier le rôle de <i>Tif1γ</i> au cours de la différenciation des progéniteurs myéloïdes</u>	63
Résultats		64
I.	Résumé de l'article soumis à publication	65
II.	Article soumis à publication : « Transcription intermediary factor 1γ is a negative regulator of a specific immature granulocytic population	67
Discussion		103
I.	De l'hématopoïèse de stress à la splénomégalie	104
II.	La perte d'expression de <i>Tif1γ</i> induit un SMP/SMD proche de la LMMC humaine	105

A. <u>Quelle en est la physiopathologie ?</u>	105
B. <u>Quel type de population monocytaire se développe ?</u>	106
1. La perte d'expression de <i>Tif1γ</i> est responsable d'une prolifération de cellules myéloïdes évoquant les MDSC de type granulocytaire	106
a. Histoire des MDSC	106
b. Nomenclature des MDSC	107
c. Phénotype des MDSC	108
d. Biologie des MDSC	110
2. Développement des MDSC	111
3. Régulation des MDSC	113
a. Au niveau de leur synthèse	113
b. Au niveau de leur signalisation	114
c. Au niveau de leur différenciation	118
d. Au niveau de leur mobilisation	119
4. Fonctionnalité des MDSC : cellules immunosuppressives	119
a. Inhibition de l'activation et de la prolifération des LT de façon directe	119
b. Inhibition de l'activation et de la prolifération des LT de façon indirecte	120
c. Les MDSC favorisent la croissance tumorale	121
5. Rôle des MDSC au cours de la grossesse	122
6. Rôle des MDSC au cours de la transplantation d'organes et des greffes allogéniques de moelle osseuse	124
7. Choix de la thérapeutique ciblée contre les MDSC	125
a. Inhibition de la myéloprolifération	125
b. Induction de la différenciation des MDSC	125
c. Diminution des exosomes	126
d. Inhibition des facteurs de croissance	126
e. Inhibition du recrutement des MDSC	127
f. Inhibition de la fonction immunosuppressive des MDSC	127
g. Inhibition des prolifération et mobilisation des MDSC	127
h. Quelles sont les perspectives thérapeutiques ciblées contre les MDSC au cours de la LMMC ?	128

8.	La diminution progressive d'expression de <i>Tiflγ</i> s'accompagne d'une expansion accrue de « PMN-MDSC <i>like</i> »	129
9.	Les granulocytes associés aux tumeurs : leur place par rapport aux MDSC	129
C.	<u>Quid de l'expansion des MDSC au cours des néoplasies durant lesquelles l'expression de <i>TIF1γ</i> est en deçà de son taux normal ?</u>	129
III.	La perte d'expression de <i>Tif1γ</i> entraîne une diminution du <i>csf-1r</i>	130
A.	<u>Impact sur la monocytopoïèse</u>	130
B.	<u>Impact sur les macrophages</u>	130
1.	Impact quantitatif	130
2.	Impact qualitatif	132
3.	Les souris <i>Tif1γ^{ΔΔ}</i> ne s'infectent pas davantage	132
IV.	Conclusion	132
Annexes		
I.	Article « <i>Tif1γ regulates the TGF-β1 receptor and promotes physiological aging of hematopoietic stem cells</i> », Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2014	136
II.	Article « <i>Age is a prognostic factor among patients with multiple myeloma younger than 66 years with high-dose melphalan: the IFM experience on 2316 patients</i> », Haematologica, 2014	161
Références bibliographiques		164

INTRODUCTION

TIF1 γ : Transcription intermediary factor 1 γ

TIF1 γ est une protéine appartenant à la famille TIF1 qui comprend trois autres membres : TIF1 α , TIF1 β et TIF1 δ . Ces quatre protéines sont incluses dans la famille TRIM (*tripartite motif-containing*). Ainsi, TIF1 α , TIF1 β , TIF1 δ et TIF1 γ correspondent respectivement à TRIM 24, 28, 66 et 33.

I. La superfamille TRIM et la famille TIF1

Soixante et onze protéines TRIM ont été décomptées chez l'Homme et la Souris, codées par 71 gènes répartis sur l'ensemble des chromosomes excepté les chromosomes 12, 18, 20, 21, 22 et Y.

Les protéines TRIM sont classées en sous-familles (I à XI) selon leur différence de structure (Short and Cox 2006). Elles agissent en tant que E3 ubiquitine ligase, les impliquant ainsi dans de nombreux processus néoplasiques. L'ubiquitinylation est une modification post-traductionnelle utilisée par les cellules eucaryotes, permettant la régulation et l'élimination des protéines de durée de vie courte, incluant les protéines de contrôle du cycle cellulaire, de signalisation cellulaire, de réparation de l'ADN (acide désoxyribonucléique) et de régulation transcriptionnelle.

A. Structure des protéines TRIM

L'ensemble des protéines TRIM à l'exception de TRIM66 est constitué au niveau N-terminal d'un domaine RING (*really interesting new gene*) (Le Douarin et al. 1996; Khetchoumian et al. 2004), d'un ou deux domaines *B-box* et d'un motif *coiled-coil* formant le domaine TRIM anciennement dénommé RBCC (*ring b-box coiled-coil*), impliqué dans les interactions protéine-protéine (Reymond et al. 2001) L'extrémité C-terminale est constituée d'un domaine PHD (*plant homeodomain*) et d'un Bromodomaine (Figure 1).

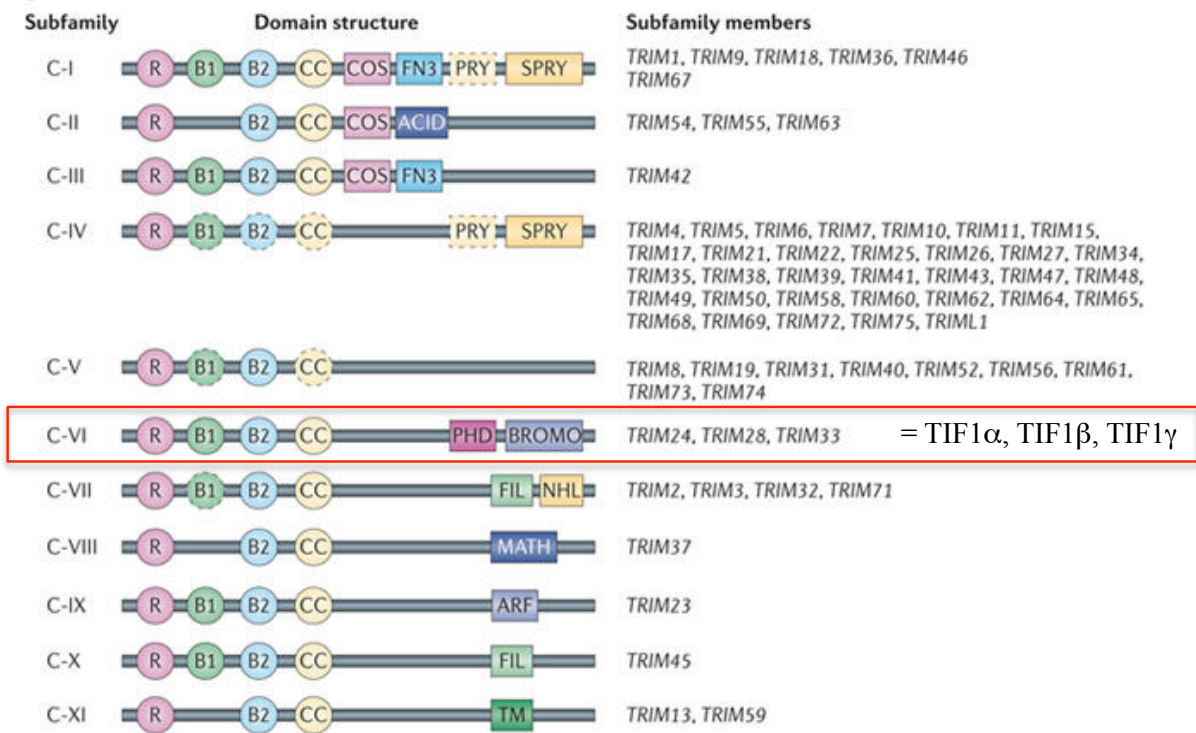


Figure 1 : Diversité de la famille TRIM (adapté d'Hatakeyama *et al.*, Nature Reviews, 2011)

B. Rôle des protéines TRIM au cours des processus néoplasiques

L'altération de l'expression de nombreuses protéines de la famille TRIM, résultant de translocations, délétions, hyperexpression du gène dont elles sont le produit de traduction, peut être responsable de processus carcinogènes (Tableau 1).

De nombreuses néoplasies solides sont liées à ces protéines TRIM du fait d'un défaut d'expression ou à l'inverse d'une hyperexpression. Par exemple, la perte d'hétérozygotie du gène *TRIM8* est responsable du processus oncogénique à l'origine de glioblastomes (Vincent *et al.* 2000), alors que l'hyperexpression des gènes codant pour TRIM27 et TRIM24 a été rapportée au cours de certains cancers du sein (Tezel *et al.* 2009; Chambon *et al.* 2011). L'hyperexpression de *TRIM29* a également été décrite lors de nombreuses néoplasies solides telles que des cancers pulmonaires, vésicaux, coliques, ovariens, endométriaux et gastriques (Mutter *et al.* 2001; Dyrskjot *et al.* 2004; Santin *et al.* 2004; Glebov *et al.* 2006; Hawthorn *et al.* 2006; Kosaka *et al.* 2007). TRIM13, TRIM19, TRIM24, TRIM28 et TRIM29 peuvent moduler la stabilité et l'activité transcriptionnelle du gène suppresseur de tumeur *TP53* (*Tumor protein 53*).

De nombreuses protéines TRIM sont également impliquées dans des hémopathies malignes. Par exemple, TRIM19 codée par le gène *PML* est retrouvée dans la translocation *PML/RAR α* (*Promyelocytic leukaemia/Retinoic acid receptor alpha*) (t(15;17)) responsable de la quasi totalité des leucémies aiguës promyélocytaires (LAP ou LAM3) (de The et al. 1991; Goddard et al. 1991; Kakizuka et al. 1991). La délétion du gène codant pour TRIM13 est à l'origine du processus néoplasique de certaines leucémies lymphoïdes chroniques (Kapanadze et al. 1998). Quant au gène *TRIM27*, il est retrouvé réarrangé avec le gène *RET* dans une translocation responsable d'un processus lymphomateux (Takahashi et al. 1985). Enfin, l'oncogenèse du myélome multiple résulte quant à elle de l'hyperexpression de *TRIM29* (Zhan et al. 2002).

Gène	Néoplasie	Altérations géniques/Niveau d'expression
<i>TRIM8</i>	Glioblastome	Délétion génique ou perte d'hétérozygotie
	Cancer du larynx	Corrélation avec progression métastatique ganglionnaire
<i>TRIM13</i>	Leucémie lymphoïde chronique B	Délétion génique
<i>TRIM19</i>	Leucémie aiguë promyélocytaire	Translocation chromosomique : <i>RARA</i>
<i>TRIM24</i>	Cancer papillaire de la thyroïde	Translocation chromosomique : <i>RET</i>
	Syndrome myéloprolifératif	Translocation chromosomique : <i>FGFR1</i>
	Cancer hépatique	Translocation chromosomique : <i>BRAF</i>
	LAM secondaire à SMD	Hyperexpression
	Cancer du sein	Hyperexpression
<i>TRIM25</i>	Cancer ovarien	Hyperexpression
	Cancer du sein	Corrélation avec un mauvais pronostic
	Cancer de l'endomètre	Expression diminuée
<i>TRIM27</i>	Lymphome	Translocation chromosomique : <i>RET</i>
	Cancer du sein	Hyperexpression
<i>TRIM28</i>	Cancer gastrique	Hyperexpression : corrélation avec un mauvais pronostic
<i>TRIM29</i>	Cancer du poumon	Hyperexpression
	Cancer de la vessie	Hyperexpression
	Cancer du côlon	Hyperexpression
	Cancer de l'ovaire	Hyperexpression
	Cancer de l'endomètre	Hyperexpression
	Myélome multiple	Hyperexpression
	Cancer gastrique	Hyperexpression
<i>TRIM31</i>	Cancer gastrique	Hyperexpression
<i>TRIM32</i>	Néoplasie de la tête et du cou	Hyperexpression
<i>TRIM33</i>	LMMC	Expression diminuée
	Carcinome hépatocellulaire	Expression diminuée
	Lésions précancéreuses du pancréas	Expression diminuée
	Néoplasie de la tête et du cou	Expression diminuée
	Cancer du poumon (NPC)	Expression diminuée
	Cancer du sein (TEM)	Expression diminuée
	Carcinome rénal à cellules claires	Expression diminuée
	Cancer colorectal (Homme)	Hyperexpression
	LAL B (Souris)	Hyperexpression
<i>TRIM40</i>	Cancer du côlon	Expression diminuée
<i>TRIM68</i>	Cancer de la prostate	Hyperexpression

Tableau 1 : Altération des gènes et protéines TRIM au cours des néoplasies

C. La famille TIF1

La famille TIF1 (*transcription intermediary factor 1*) comprend comme mentionné précédemment quatre membres (α , β , γ et δ). Il s'agit de co-régulateurs transcriptionnels (Friedman et al. 1996; Venturini et al. 1999; Beckstead et al. 2001). Comme les autres protéines TRIM mentionnées précédemment, celles de la famille TIF1 sont également impliquées dans certaines hémopathies et néoplasies solides malignes.

1. TIF1 α

TIF1 α ou TRIM24 est un co-régulateur transcriptionnel interagissant avec RAR α , récepteur à l'acide rétinoïque, pour en réprimer l'activité transcriptionnelle, ainsi qu'avec le domaine AF-2 de récepteurs nucléaires tels que le récepteur à l'œstrogène, aux hormones thyroïdiennes et le récepteur à la vitamine D3 (Le Douarin et al. 1996; vom Baur et al. 1996). L'équipe de Pier Paolo Pandolfi a en effet montré chez la Souris que Tif1 α forme avec Braf une oncoprotéine de fusion (appelée T18) modulant négativement la voie de signalisation du récepteur à l'acide rétinoïque (Zhong et al. 1999). TIF1 α module l'activité de ces récepteurs de façon positive ou négative. TIF1 α interagit par ailleurs avec les protéines HP1 α (*heterochromatin protein 1 α*), HP1 β et HP1 γ (Le Douarin et al. 1996). L'expression de TIF1 α est maintenue à un niveau élevé au sein des progéniteurs myéloïdes lorsque la différenciation granulocytaire est induite par l'acide rétinoïque ou le diméthyl sulfoxyde (DMSO), alors que son expression diminue lors de la différenciation monocyto-macrophagique par la vitamine D3 ou le TPA (*phorbol ester 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate*). TIF1 α n'est pas essentielle pour le développement, la croissance et la reproduction puisque les souris nullizygotés pour Tif1 α sont viables et fertiles. TIF1 α situé sur le chromosome 7 est impliqué dans une translocation faisant intervenir le gène *FGFR1* (*fibroblast growth factor receptor 1*) du chromosome 8, responsable d'un syndrome myéloprolifératif (Belloni et al. 2005). Par ailleurs, il agit en tant que suppresseur de tumeur au cours de carcinomes hépatocellulaires (CHC) humains et murins. En effet, dans un modèle murin Tif1 α ^{-/-} la prolifération hépatocytaire maligne diminue *via* l'inhibition de la signalisation de l'acide rétinoïque (Khetchoumian et al. 2007). La délétion homozygote pour Tif1 α augmente significativement le risque de CHC chez des souris à partir de l'âge de 9 mois. Chez l'Homme, les analyses cytogénétiques chez des patients atteints de CHC ont mis en évidence des aberrations géniques au niveau du locus

7q32 portant *TIF1 α* (Wong et al. 2000). Il est intéressant de noter que le développement du CHC lié à la délétion de *TIF1 α* est aggravé par l'absence de TIF1 γ , partenaire important de TIF1 α , suggérant que TIF1 γ agit en tant que suppresseur de tumeur en association avec TIF1 α au cours du CHC (Herquel et al. 2011). TIF1 α a également un rôle au cours du cancer du sein et son hyperexpression est associée à un pronostic péjoratif (Chambon et al. 2011). Au cours du cancer de la prostate, TIF1 α interagit avec le récepteur à l'androgène et accroît son activité transcriptionnelle en réponse à la dihydrotestostérone (DHT) (Kikuchi et al. 2009).

2. TIF1 β

TIF1 β (TRIM28 ou KAP1) appartient au complexe N-CoR1/HDAC3, et fonctionne comme un co-répresseur des facteurs de transcription à doigt de zinc de la famille KRAB (*kriippel-associated box*) (Friedman et al. 1996). Sa présence est requise d'une part pour le développement de l'embryogenèse post-implantatoire et d'autre part celle du mésoderme (Cammass et al. 2000). TIF1 β agit par ailleurs comme cofacteur et se lie aux protéines HP1 α , β et γ afin de favoriser l'inactivation génique (Eissenberg and Elgin 2000). La co-localisation de TIF1 β et HP1 α ou HP1 β est nécessaire au niveau centromérique pour induire la différenciation endodermique (Bartova et al. 2007). Son hyperexpression est corrélée à un pronostic péjoratif au cours des carcinomes gastriques car fréquemment associée aux formes disséminées au niveau péritonéal (Yokoe et al. 2010). TIF1 β subit une sumoylation au niveau de résidus lysine, modification nécessaire pour induire son activité de répresseur génique (Masclé et al. 2007).

3. TIF1 δ

TIF1 δ ou TRIM66, comme TIF1 β , est impliqué dans l'inactivation génique *via* ses interactions avec les protéines HP1, de préférence HP1 γ . Son expression est restreinte au niveau testiculaire et son activité réside essentiellement dans l'inactivation génique au cours de la phase post-méiotique de la spermatogenèse (Khetchoumian et al. 2004).

4. TIF1 γ

a. Généralités

TIF1 γ ou TRIM33 est codée par le gène *TIF1 γ* aussi appelé *PTC7* (*phosphate type two C7*) ou *RFG7* (*RET-fused gene 7*) ou *Ectodermin*. Ce gène est situé chez l'Homme sur le bras court du chromosome 1 en position 13 (1p13.1) et s'étend sur 118382 pb (paires de bases). L'ARNm (Acide ribonucléique messenger) *Tif1 γ* génère une protéine de 1127 AA (acides aminés) et code pour une protéine nucléaire de 120 kDa (Venturini et al. 1999; Yan et al. 2004) (Figures 2 et 3). TIF1 γ est le troisième membre de la famille TIF à avoir été mis en évidence après TIF1 α et TIF1 β (Venturini et al. 1999). Cinq transcrits ont été décrits par l'équipe de Hugues de Thé. Certains tissus tels que le cerveau, les poumons, les reins ou le foie expriment un seul type de transcrit alors que le cœur, les testicules, les muscles et le squelette osseux en expriment plusieurs types (Venturini et al. 1999).

Le gène *Tif1 γ* murin est localisé sur le chromosome 3 (3 F2.2) et code pour un ARNm de 8868 pb, traduit en une protéine de 1140 AA présentant 94,9% d'identité avec la protéine TIF1 γ humaine (Figure 4). Cette protéine est d'expression ubiquitaire et son ARNm a été détecté dans l'ensemble des tissus (Yan et al. 2004). TIF1 γ peut former avec TIF1 α et TIF1 β un hétéro-oligomère, faisant de TIF1 γ un co-répresseur ou un co-activateur transcriptionnel (Peng et al. 2002). TIF1 γ répond à l'organisation structurale des protéines TRIM au niveau N-terminal et son extrémité C-terminale est composée d'une séquence PHD précédant un bromodomaine nécessaire aux interactions avec la chromatine (Le Douarin et al. 1996).

Nous avons initié l'étude de *Tif1 γ* avant que la nouvelle nomenclature internationale rebaptisant la famille RBCC en TRIM ne soit en vigueur. Ainsi, nous avons utilisé la nomenclature *Tif1 γ* dans ce manuscrit pour plus de clarté par rapport aux publications antérieures de l'équipe sur *Tif1 γ* .

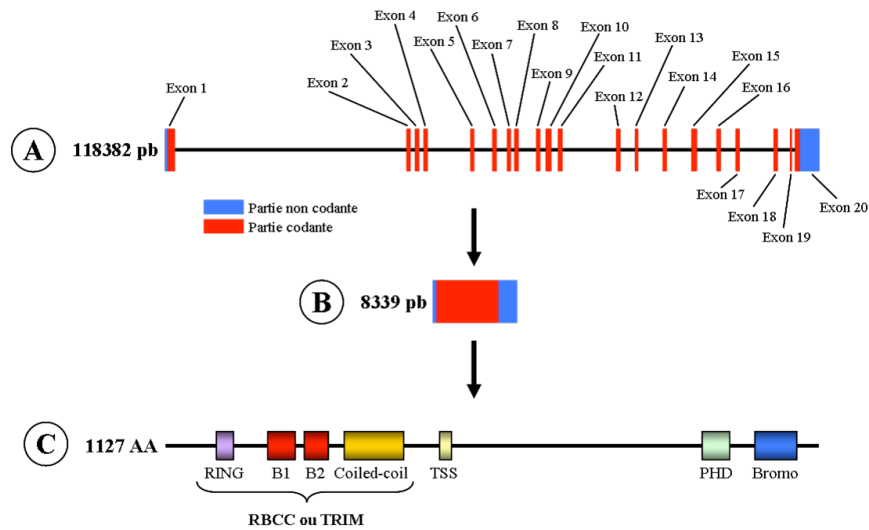


Figure 2 : Représentation schématique du gène (A), de l'ARNm (B) et de la protéine Tif1 γ humaine (C) (Référence : <http://www.sudoc.fr/15264282X>)

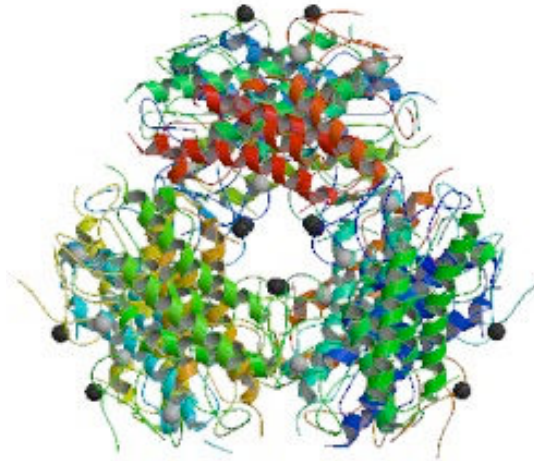


Figure 3 : Structure cristallographique de la protéine TIF1 γ humaine (Référence : <http://cansar.icr.ac.uk/cancer/molecular-targets/Q9UPN9>)

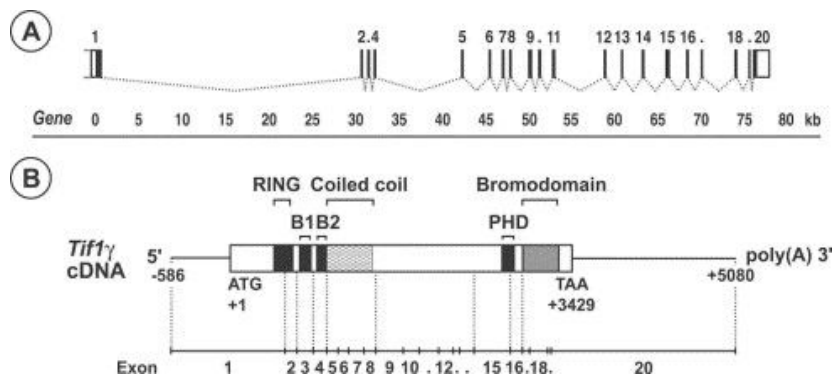


Figure 4 : Représentation schématique du gène *Tif1 γ* murin (A et B). Correspondance entre les exons et les domaines conservés de la protéine Tif1 γ murine (B) (Yan *et al.*, Gene, 2004)

Comme de très nombreuses protéines, TIF1 γ subit des modifications post-traductionnelles. Ainsi, il s'agit d'un substrat pour la sumoylation, une modification post-traductionnelle consistant en la fixation covalente de peptides appelés SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) au niveau de résidus lysine.

L'identification de TIF1 α et TIF1 β en tant que substrats de sumoylation (Ivanov et al. 2007) a incité l'équipe de Ruth Rimokh à étudier TIF1 γ comme substrat potentiel de cette modification post-traductionnelle. Son équipe a ainsi démontré que TIF1 γ est une cible de SUMO-1 et que sa sumoylation est nécessaire pour son activité répressive sur Smad4 (*mothers against decapentaplegic homolog*) (Fattet et al. 2013).

b. TIF1 γ est essentielle au développement embryonnaire

Des expériences d'inactivation de *Tif1 γ* chez le Xénope (*Xenopus laevis*) et la Souris (*Mus musculus*) ont mis en évidence son rôle crucial dans le développement embryonnaire. Chez le Xénope, cette inactivation est létale du fait de graves anomalies du développement qui est arrêté au stade de gastrula moyenne (Dupont et al. 2005). Deux modèles de souris nullizygotes (Kim and Kaartinen 2008; Morsut et al. 2010) ont révélé que la totalité des mutants homozygotes trépassé pendant la gestation. Les embryons étudiés à E9 présentent un retard de développement important par rapport aux embryons contrôles. Aucun embryon mutant n'a été retrouvé viable après 9,5 jours (stade de gastrula moyenne), démontrant le rôle essentiel de *Tif1 γ* dans le développement embryonnaire des mammifères. Le rôle répresseur de TIF1 γ intervient dès l'embryogenèse puisqu'elle contrôle négativement Smad4 pour permettre le développement de l'ectoderme (Dupont et al. 2005; Morsut et al. 2010).

c. Rôles de TIF1 γ à l'échelle moléculaire (Tableau 2)

- TIF1 γ : un co-régulateur de la transcription

L'activité de répresseur transcriptionnel de TIF1 γ chez l'Homme a été mise en évidence par l'équipe de Hugues de Thé. La séquence codante de TIF1 γ a été fusionnée avec le domaine de liaison de l'ADN de GAL4, formant la protéine de fusion TIF1 γ -GAL4. Ainsi transfectée dans des cellules de Singe COS-1, cette protéine de fusion a eu pour conséquence l'inactivation du gène dont le promoteur est fixé à la protéine de fusion. Contrairement à

TIF1 α ou TIF1 β , TIF1 γ n'interagit pas directement avec les protéines HP1 ou les récepteurs nucléaires. Cette même équipe a identifié au niveau de la protéine humaine un domaine hautement conservé appelé TSS (*TIF1 signature sequence*) dont la délétion résulte en la perte d'activité de répression transcriptionnelle de TIF1 γ (Venturini et al. 1999). Chez la Drosophile, le gène homologue de *TIF1 α , β et γ* a été caractérisé sous la forme d'un seul et même gène appelé *bonus (bon)* (Beckstead et al. 2001). Il code pour Bon, une protéine nucléaire nécessaire à la prolifération et à la survie cellulaire et qui est également requise pour le développement des organes lors de l'embryogenèse. Bon est capable d'interagir avec des récepteurs nucléaires et plus particulièrement β FTZ-F1 dont il réprime l'activité (Beckstead et al. 2001).

- TIF1 γ : un co-régulateur de l'élongation

En étudiant l'hématopoïèse défectueuse du Poisson-Zèbre mutant *moonshine*, l'équipe de Léonard Zon a démontré le rôle de *Tif1 γ* au cours de l'élongation transcriptionnelle des gènes érythroïdes. *Tif1 γ* s'associe avec des facteurs d'élongation tels que p-tefb et fact. En effet, dans les cellules déficientes pour *tif1 γ* , le facteur d'élongation p-tefb ne peut s'associer aux gènes érythroïdes. Ainsi, *tif1 γ* intervient dans la transcription des gènes érythroïdes en interagissant avec des facteurs d'élongation positifs de la transcription de ces gènes (Bai et al. 2010). Cette même équipe a montré que ce rôle de régulateur transcriptionnel des gènes du lignage érythroïde est conservé au sein des espèces. En effet, la souris porteuse d'une délétion de *Tif1 γ* dans le système hématopoïétique présente un blocage de la maturation érythroïde au niveau médullaire, compensée par une érythropoïèse splénique. Dans ce modèle murin, les gènes érythroïdes des cellules médullaires présentent également un défaut d'élongation transcriptionnelle (Bai et al. 2013).

- TIF1 γ : un régulateur de la mitose

L'équipe d'Andy Turnell a mis en évidence un autre rôle de TIF1 γ chez l'Homme, celui de permettre la progression mitotique cellulaire en agissant sur le complexe de promotion de l'anaphase appelé APC/C (*anaphase promoting complex/cyclosome*), un complexe enzymatique ubiquitine ligase requis pour le bon déroulement de la mitose des cellules eucaryotes. Ce complexe permet en effet le passage de la métaphase à l'anaphase lors de la

mitose. Au début de la métaphase, les deux chromatides sont liées par leur centromère ainsi que par leurs bras par la cohésine. La séparase, enzyme chargée de cliver la cohésine pour séparer les deux chromatides et permettre le passage à l'anaphase est, durant la métaphase, inhibée par la sécurine. C'est là qu'intervient le complexe APC/C. Celui-ci ubiquitinye la sécurine ainsi dégradée par la machinerie enzymatique du protéasome. La séparase est par conséquent libérée et peut ainsi couper et détériorer la cohésine (Peters 2006). L'activité de ce complexe nécessite l'augmentation de son affinité pour deux sous-unités protéiques, Cdc20 et Cdh1. Cette équipe a identifié TIF1 γ en tant que régulateur de ce complexe. En effet, TIF1 γ s'y associe afin d'en assurer l'activité et donc la progression de la mitose (Sedgwick et al. 2013). Dans leur étude, la diminution d'expression de TIF1 γ réduit l'activité du complexe APC/C-Cdc20, stabilise les substrats de ce complexe et conduit à l'accumulation des cellules en métaphase. Subséquemment, il en résulte l'absence de la transition métaphase-anaphase.

- TIF1 γ intervient dans la réponse aux dommages à l'ADN *via* les poly(ADP) ribose polymérases (PARP)

La survenue de dommages à l'ADN fait intervenir des enzymes de réparation appelées poly(ADPribose) polymérases 1 et 2 (PARP 1 et 2) afin de maintenir l'intégrité du génome. Des modifications rapides et efficaces de la chromatine facilitent l'accès de l'ADN endommagé à sa machinerie de réparation (Downs et al. 2007). Ces enzymes de réparation de l'ADN utilisent le NAD⁺ afin de synthétiser le polyADP ribose qui se fixe sur des substrats chromatiniens (Sato and Lindahl 1992). Cela facilite l'intervention des facteurs de réparation de l'ADN qui se lient au polyADP ribose afin de promouvoir le relâchement de la chromatine (Hakme et al. 2008). L'équipe de Shidar Ganesan a montré que la présence de TIF1 γ est requise pour la réparation de l'ADN, *via* son interaction avec ALC1 (*amplified in liver cancer 1*). En effet, TIF1 γ est rapidement recrutée au niveau des régions lésées de l'ADN selon un mécanisme dépendant des PARP et d'ALC1. Il a également été démontré que TIF1 γ est nécessaire à la dissociation d'ALC1 avec la chromatine endommagée. Leurs travaux indiquent que TIF1 γ est un régulateur d'ALC1 pour faciliter la réparation de l'ADN (Kulkarni et al. 2013).

- **TIF1 γ : une Ubiquitine E3 ligase**

Porteuse d'une activité E3 Ubiquitine ligase, TIF1 γ a pour substrat la β -caténine (Xue et al. 2015). Co-activateur transcriptionnel de la voie Wnt (Valenta et al. 2012), la β -caténine s'accumule dans le noyau cellulaire lorsqu'elle n'est pas dégradée. Elle est capable de réguler positivement des proto-oncogènes comme *c-Myc* ou *Cycline D1*, expliquant son rôle dans la tumorigenèse (Anastas and Moon 2013). Le domaine RING de TIF1 γ se lie à la β -caténine dans le noyau cellulaire, l'ubiquitinye, entraînant sa dégradation (Xue et al. 2015). Ainsi, dans des cellules humaines de glioblastome, le taux de TIF1 γ est inversement corrélé à celui de la β -caténine (Xue et al. 2015). Cela fait de TIF1 γ une protéine importante dans la régulation de la tumorigenèse.

- **TIF1 γ et l'inflammasome**

L'inflammasome a été mis en évidence en 2002 et correspond à un complexe multiprotéique activant les caspases (Martinon et al. 2002). NLRP3 (*Nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing pyrin domain containing 3*) est un récepteur de la famille Nod-like induisant le clivage puis l'activation de la caspase 1 elle-même responsable de l'activation des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 (Cerretti et al. 1992). DHX33 (*DEAH box polypeptide 33*) est une enzyme capable de capter un ARN cytosolique double brin et a un rôle dans l'inflammasome en se liant à NLRP3 (Mitoma et al. 2013). L'équipe de Yong-Jun Liu a montré que TIF1 γ participe à l'activation de l'inflammasome à travers son rôle d'ubiquitinylation de DHX33 (Weng et al. 2014).

- **TIF1 γ : membre des voies de signalisation du TGF β**

o Inhibition de Smad en tant qu'Ubiquitine E3 ligase

La voie de signalisation du TGF β fait intervenir des récepteurs transmembranaires de type sérine/thréonine kinase (T β RI et T β RII). La liaison de TGF β à T β RII induit la phosphorylation et le recrutement de T β RI, transmettant ainsi le signal *via* la phosphorylation de Smad2 ou Smad3. Une fois phosphorylés, ces derniers forment un hétérodimère avec leur partenaire Smad4. Ce complexe est ensuite transloqué dans le noyau afin de contrôler la

transcription de gènes cibles (Schmierer and Hill 2007). La signalisation du TGF β a ainsi un rôle sur la préservation de l'état de quiescence des CSH (cellule souche hématopoïétique) (Fortunel et al. 2000; Yamazaki et al. 2009), en évitant leur ré-entrée dans le cycle cellulaire (Yamazaki et al. 2006).

Le rôle répresseur de TIF1 γ sur Smad4 entraîne une régulation négative de cette voie de signalisation mais d'une manière qui fait encore débat. D'après l'équipe de Stefano Piccolo, son rôle répresseur, primordial dans le développement embryonnaire de l'ectoderme chez la Souris et le Xénope, fait intervenir l'ubiquitinylation de Smad4 grâce à son activité E3 Ubiquitine ligase dépendante de son domaine PHD ou son Bromodomaine (Dupont et al. 2005; Morsut et al. 2010). Le contrôle de Smad4 par Tif1 γ est dynamique puisque cette même équipe a montré que Smad4 monoubiquitinylée peut être désubiquitinylée par l'enzyme FAM/UPS9x et ainsi recyclée (Dupont et al. 2009) (Figure 5a). D'après ses données, l'équipe de Joan Massagué propose que TIF1 γ réprime cette voie de signalisation à travers une compétition avec Smad4 pour la formation du complexe avec les formes phosphorylées de Smad2/3 (He et al. 2006; Xi et al. 2011) (Figure 5b). Enfin, l'équipe de Caroline Hill a montré que TIF1 γ inhibe la voie de signalisation du TGF β en réduisant le temps de résidence des complexes Smad activés au niveau du promoteur des gènes cibles (Agricola et al. 2011).

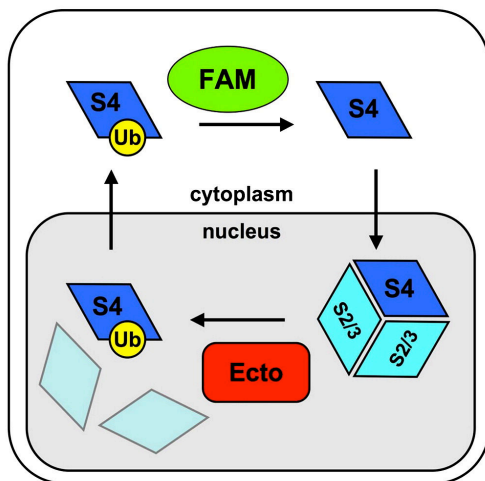


Figure 5a : Théorie proposée par Stefano Piccolo : TIF1 γ ubiquitinye Smad4 ainsi exportée dans le cytoplasme où Smad4 peut être désubiquitinylée par FAM/UPS9x afin d'être recyclée (d'après Dupont *et al.*, Cell, 2009)

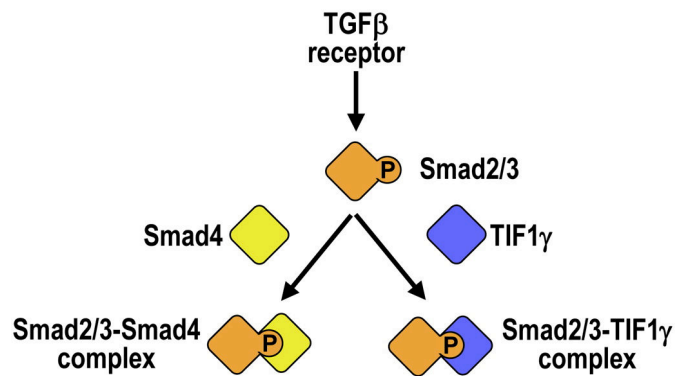


Figure 5b : Théorie proposée par Joan Massagué : TIF1 γ interagit avec Smad2/3P en compétition avec Smad4 (adapté de He *et al.*, Cell, 2006)

- Régulation du TGF β RI via sa polyubiquitinylation

Notre équipe a récemment montré chez la souris porteuse d'une invalidation de *Tif1 γ* au niveau hématopoïétique une diminution de la polyubiquitinylation du TGF β RI, confirmant le rôle de l'activité E3 Ubiquitine ligase de Tif1 γ dans la régulation de la voie de signalisation du TGF β (Quere et al. 2014).

- TIF1 γ : une SUMO E3 ligase

La transition épithélio-mésenchymateuse ou EMT (*epithelial-mesenchymal transition*) est une étape indispensable au développement et à l'homéostasie tissulaire. Son rôle est démontré au cours de processus néoplasiques, plus particulièrement au cours des proliférations métastatiques tumorales (Thiery 2002). Le TGF β intervient positivement au cours de l'EMT et permet la progression des cellules épithéliales tumorales (Thiery et al. 2009).

Le régulateur transcriptionnel SnoN (*ski-related novel*) qui existe sous deux isoformes, SnoN1 et SnoN2, interagit avec les facteurs de transcription Smad2, 3 et 4 et supprime l'EMT induite par le TGF β . TIF1 γ intervient en tant que SUMO E3 ligase catalysant la sumoylation de SnoN1 au niveau de différents résidus lysine. SnoN1 ainsi sumoylée peut bloquer l'EMT induite par le TGF β (Ikeuchi et al. 2014).

L'équipe de Ruth Rimokh a par ailleurs démontré le rôle régulateur de TIF1 γ sur l'EMT dépendante du TGF β au sein des cellules épithéliales mammaires humaines MCF10A (Hesling et al. 2011). Leur travail a consisté en l'étude de la réponse au TGF β 1 de ces cellules porteuses d'une invalidation de *TIF1 γ* par une stratégie de siRNA. Il est constaté une

importante augmentation de l'EMT des cellules après traitement au TGF β 1. La même équipe a identifié le rôle tenu par TIF1 γ durant la différenciation terminale des cellules épithéliales alvéolaires mammaires ainsi qu'au cours de la lactation *via* son activité de répression de Smad4 (Hesling et al. 2013).

d. Rôle de TIF1 γ au cours du vieillissement

Comme l'ensemble des tissus, le système hématopoïétique vieillit au cours du temps. Ce vieillissement est associé à une augmentation de l'incidence des hémopathies malignes telles que les syndromes myéloprolifératifs, les leucémies aiguës ou chroniques (Henry et al. 2011). La CSH est capable d'assurer le renouvellement constant des cellules sanguines tout au long de la vie mais ses capacités à générer le lignage lymphoïde décline avec l'âge alors que la myélopoïèse est préservée voire privilégiée, du fait d'une différenciation accrue en progéniteurs myéloïdes plutôt que lymphoïdes (Sudo et al. 2000; Rossi et al. 2005). Notre équipe a montré que la baisse d'expression de *Tif1 γ* au niveau hématopoïétique participe au vieillissement (Quere et al. 2014). Cela a été mis en évidence grâce à notre modèle murin porteur de la délétion conditionnelle de *Tif1 γ* à partir de la CSH. De nombreuses caractéristiques de vieillissement accéléré de l'hématopoïèse ont été mises en évidence dans notre modèle. A l'instar du vieillissement physiologique hématopoïétique, le nombre de LT-HSC augmente dans les souris *Tif1 γ ^{Δ/Δ}* âgées de 4 mois, en comparaison avec celui des souris contrôles âgées de 20 mois. De plus, malgré leur prolifération médullaire, les CSH *Tif1 γ ^{Δ/Δ}* présentent une plus faible capacité de différenciation en leucocytes. Par ailleurs, la différenciation myéloïde des CSH est favorisée aux dépens de la lymphopoïèse. L'augmentation de la phosphorylation de l'histone H2AX, très bon indicateur des cassures double-brin de l'ADN et donc du vieillissement cellulaire, au sein des souris *Tif1 γ ^{Δ/Δ}* âgées de 4 mois, va également dans ce sens, de même que l'altération de l'expression génique des CSH *Tif1 γ ^{Δ/Δ}* partiellement concordante aux cellules contrôles vieillissantes. Ce vieillissement accéléré des souris *Tif1 γ ^{Δ/Δ}* pourrait correspondre à la première étape du développement de ce syndrome myéloprolifératif/myélodysplasique. Ce phénomène est relié à la voie de signalisation du TGF β . En effet, les cellules contrôles âgées de 20 mois sont plus sensibles au TGF β que les cellules contrôles plus jeunes, mais de façon équivalente aux cellules *Tif1 γ ^{Δ/Δ}* âgées de 4 mois.

e. Rôle de TIF1 γ au cours de l'hématopoïèse normale

- **L'hématopoïèse normale**

L'hématopoïèse est un processus complexe hautement régulé et hiérarchisé, faisant intervenir la CSH multipotente de la moelle osseuse, responsable de la production de cellules matures circulant dans le sang périphérique (Bryder et al. 2006). La CSH permet donc la production, la maturation et le maintien constant et contrôlé de l'ensemble des cellules sanguines. Chez l'Homme, la quantité totale de cellules sanguines est de 20×10^{12} pour les hématies, 10^{12} pour les plaquettes et $0,5 \times 10^{12}$ pour les leucocytes. Les hématies ont une durée de vie de l'ordre de 120 jours, les plaquettes de 8 à 10 jours et les polynucléaires neutrophiles (PNN) de 24 à 72 heures. Ces chiffres étant constants, cette homéostasie exige un équilibre entre la production des cellules et leur entrée en apoptose. Ainsi quotidiennement, ce processus hautement régulé permet de générer 250×10^9 hématies, 150×10^9 plaquettes et 100×10^9 PNN. De façon physiologique, 10^{11} à 10^{12} cellules sanguines matures sont fabriquées chaque jour à partir de la CSH multipotente médullaire.

Afin de maintenir l'homéostasie cellulaire, la CSH se différencie en une cellule-fille responsable de l'hématopoïèse active et une autre cellule-fille qui garantit le renouvellement de la CSH (Simons and Clevers 2011).

L'hématopoïèse débute très précocément au cours de l'embryogenèse dans le sac vitellin jusqu'à la 8^{ème} semaine (Cumano and Godin 2007). L'hémangioblaste, cellule initiatrice de ce processus, est un précurseur bi-potent dérivé du mésoderme, d'où proviennent les cellules endothéliales et les cellules hématopoïétiques (Cumano and Godin 2007). Puis la région aorte-gonade-mésonephros prend le relai avant que l'hématopoïèse fœtale ne s'installe au niveau du foie, de la rate et enfin de la moelle osseuse, site définitif de l'hématopoïèse adulte. Elle siège de façon principale au niveau des os courts, des os plats et de l'épiphyse des os longs. Cela explique le choix des sites de ponction de moelle osseuse chez l'adulte : le sternum et la crête iliaque.

o La cellule souche hématopoïétique

Une seule cellule multipotente, la CSH, est capable de produire l'ensemble des cellules matures sanguines (hématies, plaquettes, leucocytes : PNN, PN éosinophiles, PN basophiles, monocytes, lymphocytes) par prolifération intense et différenciation. Le nombre de CSH est

très limité (0,01 à 0,05% de la population médullaire). Son existence a été démontrée dans les années 1960 par Till et McCulloch (Till and Mc 1961). L'irradiation létale de souris suivie d'une greffe de moelle osseuse permettait la reconstitution de l'hématopoïèse murine normale via la formation de colonies spléniques nommées CFU-S (*Colony forming unit in the spleen*), dont le nombre était proportionnel à celui des cellules médullaires transplantées. De cette façon, ces deux pionniers ont démontré l'existence de cellules médullaires capables d'auto-renouvellement et de différenciation, permettant de générer la quasi-totalité des lignages hématopoïétiques. Ces cellules furent appelées cellules souches hématopoïétiques.

Chez l'adulte, alors que la très grande majorité des CSH reste quiescente, en phase G0 du cycle cellulaire grâce à des interactions avec des ostéoblastes produisant de la thrombopoïétine (Yoshihara et al. 2007), une faible proportion assure l'homéostasie des cellules sanguines matures.

Par la suite, il a été démontré que même le compartiment des CSH est très hétérogène. Ainsi, trois sous-types de CSH sont distingués selon leur potentiel de reconstitution de l'hématopoïèse au cours du temps. Les LT-HSC (*long term-haematopoietic stem cell*), les IT-HSC (*intermediate term-HSC*) et les ST-HSC (*short term-HSC*) qui respectivement reconstituent l'hématopoïèse durant la vie entière, de 6 à 8 mois et un maximum de 2 mois (Spangrude et al. 1988; Benveniste et al. 2010) après transplantation médullaire dans les modèles murins.

Les CSH siègent dans la moelle osseuse, au sein de niches hématopoïétiques, correspondant à un microenvironnement primordial pour le maintien de leur capacité d'auto-renouvellement et de différenciation. On distingue ainsi la niche ostéoblastique et la niche vasculaire selon la proximité des CSH avec respectivement les ostéoblastes (Yoshihara et al. 2007) et les cellules endothéliales vasculaires (Kiel and Morrison 2006) (Figure 6). La chimiokine CXCL12 (*CXC motif ligand 2*) contrôle la migration des CSH au sein de la niche vasculaire (Kiel and Morrison 2006).

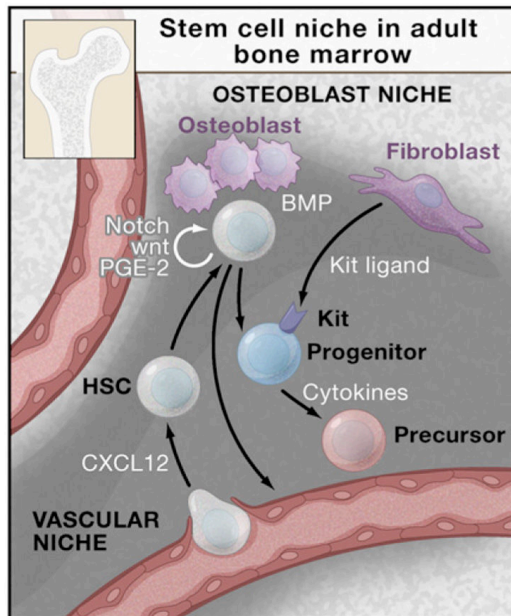


Figure 6 : la CSH au sein de la niche hématopoïétique médullaire (d'après Orkin *et al.*, Cell, 2008)

○ La hiérarchie hématopoïétique

Le modèle canonique de l'hématopoïèse de Weissman (Weissman 2000) (Figure 7), malgré ses remises en question, reste à ce jour le modèle de hiérarchie hématopoïétique le plus communément admis. Il fait intervenir différents compartiments cellulaires : la CSH, les progéniteurs, les précurseurs et enfin les cellules matures sanguines.

Sous l'influence de facteurs de croissance et de transcription, la CSH va s'engager dans un programme de différenciation, perdant ainsi sa multipotentialité.

Interviennent également les microARN (miARN). Dans les années 1990 a été mise en évidence une famille d'ARN non codants, de petite taille, simple brin, responsable de la régulation traductionnelle de certains gènes. Ces ARN agissent comme régulateurs post-transcriptionnels, capables de se lier à une séquence complémentaire de l'ARNm d'un gène cible, entraînant la dégradation ou la répression traductionnelle de cet ARNm (Lee et al. 1993).

Les progéniteurs hématopoïétiques représentent une population hétérogène de cellules, correspondant au devenir d'une CSH qui s'est engagée dans une voie de différenciation. Leurs capacités d'autorenouvellement diminuent au fur et à mesure de leur différenciation. Ils ne sont pas reconnaissables morphologiquement. Les cultures clonogéniques réalisées à partir de cellules de moelle osseuse soumises à des facteurs de croissance durant 10 jours dans un milieu de méthylcellulose limitant la mobilité cellulaire, permettent de générer des colonies appelées CFU (*colony forming unit*) dont la morphologie reconnaissable dépend de la

cytokine utilisée pendant la culture. Ainsi sont générées les CFU-E (Erythroid), les CFU-M (Monocyte-Macrophage) etc.

Les précurseurs hématopoïétiques sont des cellules médullaires ayant perdu toute capacité d'auto-renouvellement. Ils sont engagés dans la différenciation vers un lignage médullaire spécifique. Il s'agit des premières cellules morphologiquement identifiables de chaque lignage. Selon ceux-ci, se produisent de 3 à 5 mitoses si bien qu'un précurseur peut générer 8 à 32 cellules matures. Grâce à ces nombreuses mitoses, le rendement de l'hématopoïèse est très efficace. Ces précurseurs subissent des modifications morphologiques communes, concourant à leur maturation. Ainsi, sont observées une diminution de la taille cellulaire, du rapport nucléocytoplasmique, de l'expression de marqueurs membranaires, la perte des nucléoles et la condensation chromatiniennne. Ils acquièrent par ailleurs des modifications spécifiques de chaque lignage dont la polylobulation nucléaire et l'apparition de granulations cytoplasmiques pour le lignage granulocytaire ou l'expulsion nucléaire pour le lignage érythroïde. Enfin, concernant le lignage mégacaryocytaire, les précurseurs subissent une endomitose responsable d'un doublement du matériel génétique sans division cellulaire, formant les mégacaryocytes. Les plaquettes matures circulantes résultent de la fragmentation du cytoplasme des mégacaryocytes.

Seules les cellules matures et fonctionnelles passent dans la circulation sanguine qui n'est qu'un lieu de passage pour certaines d'entre elles avant la colonisation des tissus, où chaque cellule va pouvoir assurer sa fonction. Certaines cellules matures sont encore capables de différenciation telles que les monocytes. Enfin, les lymphocytes poursuivent leur maturation dans le thymus ou la moelle osseuse, donnant respectivement naissance aux lymphocytes T et B.

Selon le modèle de Weissmann (Figure 7), les CSH multipotentes se différencient en progéniteurs multipotents appelés MPP (*multipotent progenitor*), sans capacité d'autorenouvellement, se différenciant eux-mêmes en progéniteurs lymphoïdes communs (CLP : *common lymphoid progenitor*) et myéloïdes communs (CMP : *common myeloid progenitor*). Les CMP correspondent aux colonies CFU-GEMM (*colony forming-unit granulocyte, erythrocyte, monocyte, megakaryocyte*). Ils produisent des progéniteurs érythro-mégacaryocytaires (MEP : *megakaryocyte-erythrocyte progenitor*) et des progéniteurs granulo-monocytaires (GMP : *granulocyte-monocyte progenitor*). Les MEP correspondent aux progéniteurs mégacaryocytaires (BFU-Mk : *Burst forming unit-Megakaryocyte* puis CFU-Mk) et érythroïdes (*BFU-erythrocyte* puis CFU-E), se différenciant respectivement en précurseurs mégacaryocytaires et érythroïdes. Les GMP correspondent aux colonies CFU-GM

(*CFU-granulocyte, monocyte*), donnent naissance aux progéniteurs granulocytaires (*CFU-G : CFU-granulocyte*) et monocytaires (*CFU-M : CFU-monocyte*), se différenciant respectivement en précurseurs granulocytaires et monocytaires. Les CLP produisent quant à eux les cellules du lignage lymphoïde.

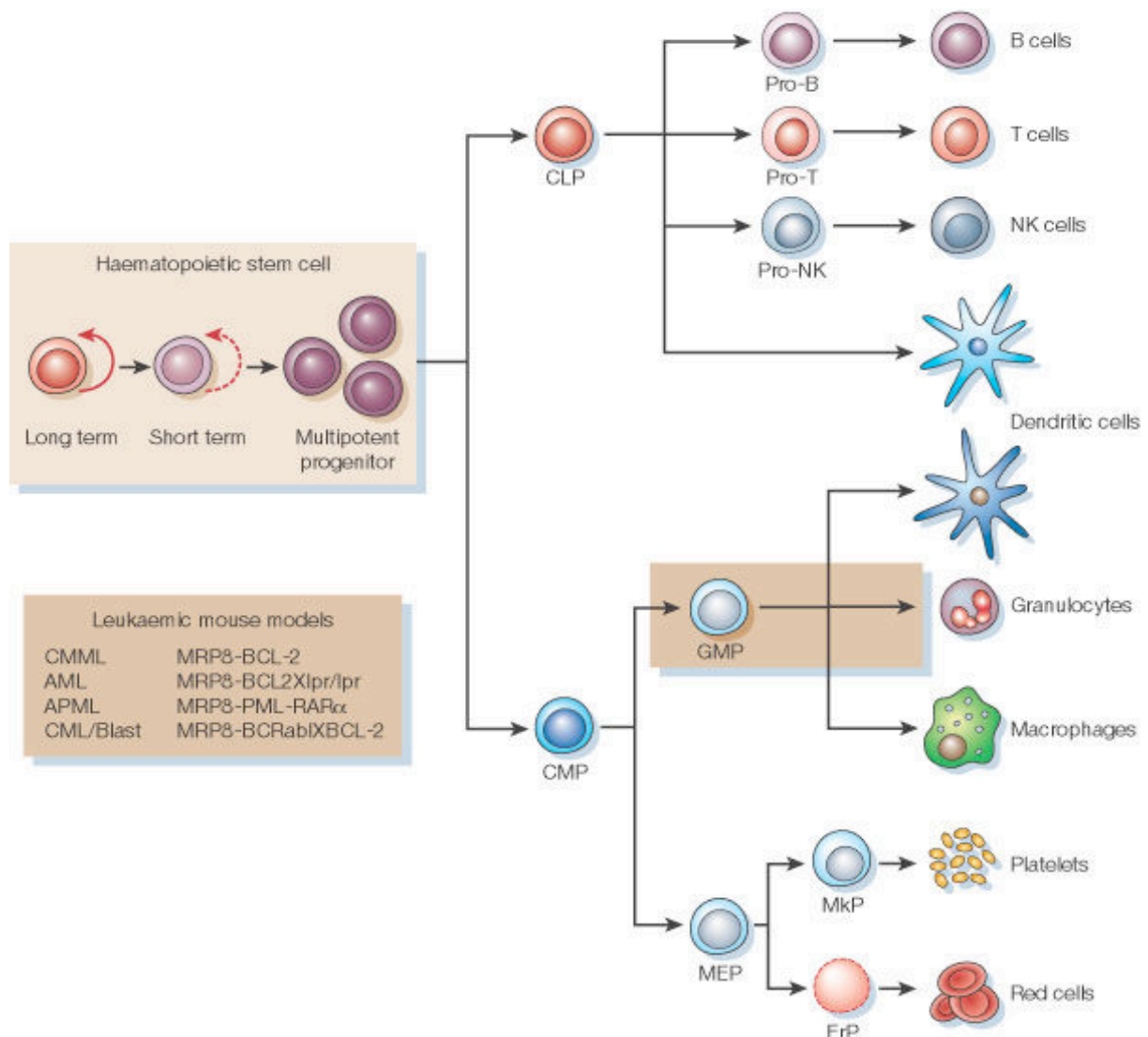


Figure 7 : Modèle de la hiérarchie hématopoïétique selon Weissman (d'après Reya *et al.*, Nature, 2001)

- **TIF1 γ stimule la différenciation érythroïde (Figure 9)**

Son rôle au cours de l'hématopoïèse a été initialement étudié chez le Poisson-Zèbre (*Danio rerio*). Grâce à un criblage génétique à grande échelle, l'équipe de Leonard Zon a caractérisé un mutant appelé *moonshine* qui présente une anémie sévère due à l'absence d'expression du facteur de transcription érythroïde *gata1* (Ransom et al. 1996). L'étude des embryons mutants

pour le gène *moonshine* (*mon*) a montré qu'ils possèdent peu ou pas d'érythroblastes (érythroblastopénie) et que leur érythropoïèse est bloquée (Figure 8). En 2004, le gène *mon* a été identifié comme étant l'orthologue du gène *TIF1 γ* humain (Ransom et al. 2004). L'étude de l'hématopoïèse du mutant *moonshine* montre que le produit du gène *mon* est essentiel à l'érythropoïèse embryonnaire et adulte. En effet, 22 heures après la fertilisation, les marqueurs hématopoïétiques tels que *gata1*, *gata2* et *ikaros* ne sont pas détectés au niveau des sites hématopoïétiques embryonnaires alors que l'expression des marqueurs *myb* et *rag1* (*recombination activating gene 1*) indique que les mutants *mon* possèdent un développement myéloïde et lymphoïde normal. Au cours de l'érythropoïèse humaine, TIF1 γ entretient des relations étroites avec les protéines Smad. En effet, dans les cellules souches/progénitrices humaines CD34⁺ provenant de sang de cordon, il a été montré que TIF1 γ se lie sélectivement aux formes phosphorylées Smad2 et Smad3 en compétition avec Smad4, contrôlant ainsi la différenciation érythroïde des CSH. A l'opposé, le complexe Smad2/3P-Smad4 permet la quiescence de ces cellules (He et al. 2006). L'équipe de Roger Patient a par ailleurs étudié les relations entre *tif1 γ* , *spi-1/pu.1* (*SSVF Provirus integration-1/Purine box binding protein-1*) et *gata1* dans différentes populations cellulaires du Poisson-Zèbre. *Tif1 γ* favorise l'engagement érythroïde des cellules souches au détriment du développement myéloïde en inhibant l'expression de *spi-1/pu.1* et en stabilisant celle de *gata1* dans le tissu hématopoïétique caudal (Monteiro et al. 2011). Après ses travaux chez le Poisson-Zèbre, l'équipe de Léonard Zon s'est intéressée au rôle de Tif1 γ chez la Souris et chez l'Homme. Elle a mis en évidence que *tif1 γ* s'associe au complexe du facteur de transcription *scl/tal1* (*stem cell leukemia/T-cell acute lymphocytic leukemia 1*) qui comprend *gata1*, intervenant dans la transcription des gènes érythroïdes, plus particulièrement au cours de l'élongation transcriptionnelle de ceux-ci. (Bai et al. 2010; Bai et al. 2013). A l'inverse, des travaux menés en parallèle par l'équipe de Paul-Henri Roméo ont montré que Tif1 γ s'associe à Spi-1/Pu.1 et Scl/Tal1 afin de réprimer l'activité de ces facteurs de transcription (Kusy et al. 2011).

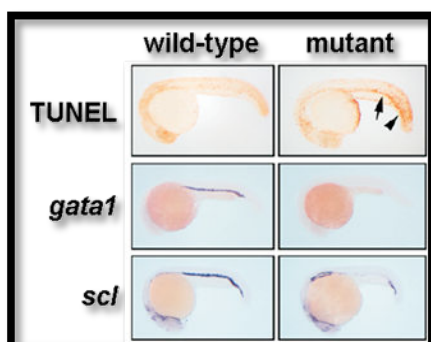


Figure 8 : *moonshine* est essentiel à l'érythropoïèse embryonnaire du Poisson-Zèbre (adapté de Ransom *et al.*, PLoS Biol., 2004)

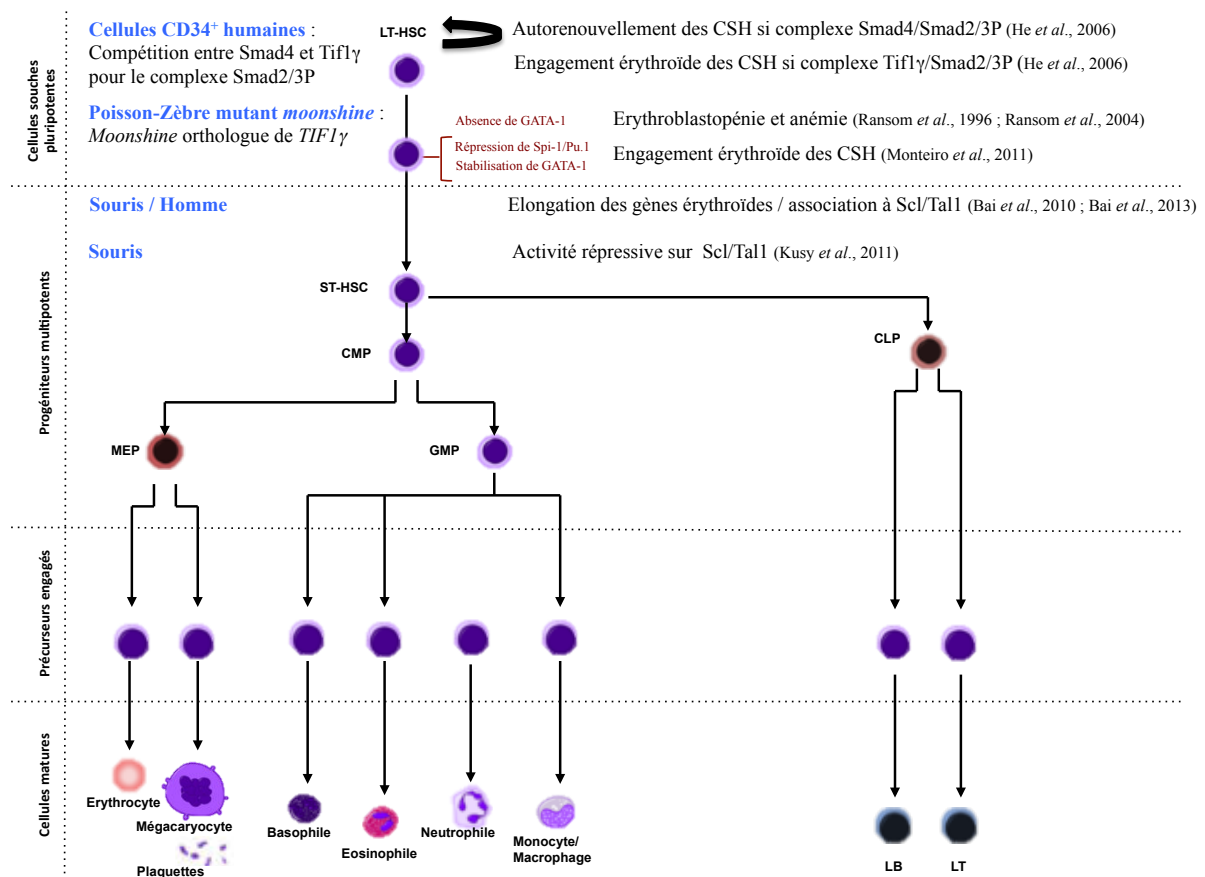


Figure 9 : Représentation schématique des différents rôles de Tif1 γ au cours de l'hématopoïèse et plus spécifiquement au cours de l'érythropoïèse

Rôles de Tif1 γ dépendants de son activité E3 Ubiquitine ligase	Rôles de Tif1 γ indépendants de son activité E3 Ubiquitine ligase
Souris : Développement embryonnaire de l'ectoderme : Polyubiquitinylation de Smad4 (Dupont <i>et al.</i> , 2004 ; Morsut <i>et al.</i> , 2010)	Souris / Homme : Co-régulateur transcriptionnel (Venturini <i>et al.</i> , 1999 ; Kusy <i>et al.</i> , 2011)
Xénope : Inhibition de la voie de signalisation du TGF β : Monoubiquitinylation de Smad4 (Dupont <i>et al.</i> , 2009)	Souris / Homme : Co-régulateur de l'élongation des gènes érythroïdes (Bai <i>et al.</i> , 2010 ; Bai <i>et al.</i> , 2013)
Homme : Activation de l'inflammasome : Polyubiquitinylation de DHX33 dans les macrophages dérivés des monocytes et les macrophages dérivés des cellules THP-1 (LAM) (Weng <i>et al.</i> , 2014)	Homme : Régulateur de la mitose (Sedgwick <i>et al.</i> , 2013)
Souris : Régulation du TGF β RI <i>via</i> sa polyubiquitinylation, accélération du vieillissement hématopoïétique (Quéré <i>et al.</i> , 2014)	Homme : Régulateur d'ALC1 pour la réparation des dommages à l'ADN (Kulkarni <i>et al.</i> , 2013)
Homme : Inhibition de la β -catéchine nucléaire par ubiquitinylation (Xue <i>et al.</i> , 2015)	Homme : SUMO E3 ligase : Inhibition de l'EMT (Hesling <i>et al.</i> , 2013)

Tableau 2 : Synthèse des différents rôles tenus par Tif1 γ , dépendant ou non de son activité E3 Ubiquitine ligase

Tifl γ intervient également au cours de processus pathologiques et notamment néoplasiques, essentiellement en tant que gène suppresseur de tumeur. A ce titre, notre équipe a généré un modèle murin porteur d'une invalidation homozygote de *Tifl γ* au niveau du système hématopoïétique. Cette souris homozygote a été appelée *Tifl $\gamma^{\Delta/\Delta}$* et développe un phénotype proche de la leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) humaine, associant à la fois des signes dysplasiques ainsi qu'une prolifération myéloïde médullaire, sanguine et splénique. Ces aspects qui seront abordés en détail ultérieurement expliquent pourquoi nous sommes intéressés aux myélopoïèses normale et pathologique et plus spécifiquement aux monocytes et à leur différenciation.

II. Les monocytes et leur différenciation

A. Le monocyte

Ce leucocyte appartient au système des phagocytes mononucléés et est capable de se différencier en macrophages, cellules dendritiques et ostéoclastes (Randolph et al. 1999; Geissmann et al. 2003; Varol et al. 2007). Il est, par sa taille, la plus grande des cellules circulantes sanguines. Il mesure de 20 à 25 μm avec un rapport nucléocytoplasmique faible, inférieur à 0,5. Son noyau est irrégulier, réniforme, non nucléolé, à chromatine fine et non condensée. Son cytoplasme gris « ciel d'orage » est parfois vacuolisé et siège de granulations azurophiles (Figure 10). Les monocytes représentent en situation physiologique 2 à 7% des leucocytes humains, soit 100 à 1000/ mm^3 , et 4% des leucocytes murins.

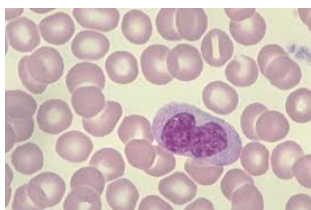


Figure 10 : Monocyte sanguin
Coloration au MGG (May-Grünwald-Giemsa)

Cette cellule a un rôle majeur au cours des réponses inflammatoire (Strauss-Ayali et al. 2007; Geissmann et al. 2008; Serbina et al. 2008) et immunitaire innée (Auffray et al. 2007), accompagnée par les polynucléaires neutrophiles et les cellules *natural killer*. Le monocyte participe également à l'homéostasie cellulaire en détruisant les cellules apoptotiques et les composés toxiques (Franc et al. 1996; Williams 2007).

De par ses différents rôles physiologiques, le monocyte est également responsable de pathologies inflammatoires telles que l'athérosclérose et les arthrites (Libby et al. 2008).

B. La monocytopoïèse

Elle siège dans la moelle osseuse hématopoïétique à partir d'une cellule indifférenciée et multipotente : la cellule souche hématopoïétique. De nombreuses étapes d'engagement de la CSH aboutissent à la formation du monocyte qui se différencie ainsi à partir du CMP, lui-même à l'origine du GMP (Iwasaki and Akashi 2007). Celui-ci est à l'origine du progéniteur macrophage-cellule dendritique ou MDP (*macrophage-dendritic cell progenitor*) (Figure 11). Le développement des monocytes à partir du MDP se déroule dans la moelle osseuse, majoritairement sous la direction de l'axe CCR2 (*C-C motif receptor 2*)/CCL2 (*C-C motif ligand 2*) mais aussi CXCR4 (*C-X-C motif receptor 4*)/CXCL12 (*C-X-C motif ligand 12*) (Geissmann et al. 2008). Sous l'influence de l'IL-3 (*Interleukine-3*) et du GM-CSF puis du CSF-1, vont se différencier successivement les précurseurs en monoblastes, en promonocytes et enfin en monocytes (Iwasaki and Akashi 2007). Ceux-ci passent ensuite dans la circulation sanguine pour assurer leur rôle de cellules immunitaires *via* la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires d'une part et la phagocytose d'autre part (Serbina et al. 2008). Lors des processus inflammatoires, secondaires à une infection par exemple, le récepteur cytokinique CCR2 et ses ligands CCL2 et CCL7 assurent le recrutement des monocytes sur les sites inflammatoires, en les mobilisant à partir de la moelle osseuse (Tsou et al. 2007). Cependant, des études plus récentes ont mis en évidence que la moelle osseuse n'est pas la seule source de monocytes. Ainsi, la rate est un réservoir de monocytes provenant de la pulpe rouge. Dans ce cas, CCR2 n'intervient pas dans la mobilisation des monocytes et c'est l'angiotensine II qui en est responsable (Swirski et al. 2009).

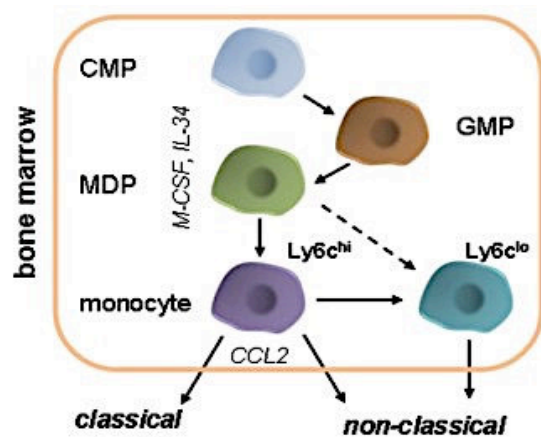


Figure 11 : La différenciation des monocytes à partir des progéniteurs hématopoïétiques médullaires chez la Souris (adapté de Zimmermann *et al.*, Front. Physiol.,2012)

1. Les cytokines ou facteurs de croissance

Le CSF-1 et son récepteur (CSF-1R, CD115 ou M-CSFR) ont une place centrale au cours de la monocytopoïèse.

Le CSF-1R est un récepteur de type tyrosine kinase, indispensable à la survie, la prolifération et la différenciation des monocytes et des macrophages (Droin and Solary 2010). Il est codé par le proto-oncogène *cfms* (*Cellular-feline McDonough sarcoma*). Les souris déficientes en *csf-1r* présentent une monocytopénie majeure, une ostéopétrose et des défauts de fertilité (Dai et al. 2002).

Le phénotype des souris déficientes pour *Csf-1* (*Csf1^{op/op}* mice) est moins marqué, suggérant que cette cytokine ne soit pas le seul ligand de CSF-1R et que tous les effets de ce facteur de croissance ne soient pas associés à son récepteur. En effet, l'IL-34 (*Interleukine-34*) a été décrite comme second ligand de ce récepteur (Lin et al. 2008). L'équipe de Dominique Heymann a par ailleurs montré que l'IL-34 forme avec le CSF1 une cytokine hétéromérique responsable d'une activation spécifique du CSF-1R caractérisée par une phosphorylation plus importante de ses résidus tyrosine (Segaliny et al. 2015). Le paragraphe III.D.1 détaillera la signalisation du CD115.

2. Les facteurs de transcription

a. SPI-1/PU.1

SPI-1/PU.1 (*SSFV provirus integration-1/purine box binding protein.1*), facteur de transcription de la famille ETS, induit l'engagement des progéniteurs vers la voie de

différenciation myéloïde (Nerlov and Graf 1998). Aussi sa présence est-elle requise pour la différenciation du progéniteur myéloïde commun au cours de la myélopoïèse précoce (Dakic et al. 2005; Iwasaki et al. 2005). Spi-1/Pu.1 favorise la différenciation monocyttaire, au détriment des voies érythro-mégacaryocytaire et granulocytaire en étant respectivement responsable d'un effet antagoniste sur GATA-1 et C/EBP α (Dahl et al. 2003). Il réprime également l'activité de *GATA-2*, s'opposant ainsi à la génération des mastocytes (Walsh et al. 2002). Il existe ainsi une coopération stable entre Spi-1/Pu.1 et C/ebp α , qui active Gfi-1 assurant l'engagement granulocytaire (Karsunky et al. 2002; Hock et al. 2003), pendant que Spi-1/Pu.1 active Egr2 (Nguyen et al. 1993; Krishnaraju et al. 2001) associé à son co-facteur Nab pour induire la différenciation macrophagique.

b. IRF8

Spi-1/Pu.1 n'est pas le seul facteur de transcription agissant sur le destin monocyttaire du progéniteur.

Irf8 (*interferon regulatory factor 8*) appelé aussi ICSBP (*interferon consensus sequence-binding protein*) intervient également au détriment de la voie d'engagement granulocytaire (Tamura et al. 2000) favorisant ainsi la différenciation monocyttaire. Ce facteur transcriptionnel contrôlé par l'IFN γ (Interferon gamma), est activé par Spi-1/Pu.1. Contrairement à Spi-1/Pu.1 et Klf4 (*Krüppel like factor 4*) dont la délétion homozygote est létale, le déficit en Irf8 est viable. IRF8 promeut la différenciation des monocytes à partir des GMP et inhibe la granulopoïèse (Tamura et al. 2000). Ainsi, un déficit d'expression d'IRF8 est responsable de l'accumulation de GMP, de l'expansion des granulocytes et d'un défaut de différenciation monocyttaire (Holtschke et al. 1996; Scheller et al. 1999) ainsi que d'une déficience dans la production de cellules dendritiques et de macrophages (Holtschke et al. 1996; Tsujimura et al. 2003; Becker et al. 2012). Enfin, il a récemment été montré un rôle d'IRF8 à la fois dans la différenciation des monocytes Ly6C^{high} (monocytes CD14⁺ chez l'Homme) et Ly6C^{low} (monocytes CD16⁺ chez l'Homme). Les souris déficientes pour Irf8 ont un nombre significativement plus faible de monocytes Ly6C^{high} et Ly6C^{low} au niveau sanguin, médullaire et splénique (Becker et al. 2012; Kurotaki et al. 2013).

c. KLF4

KLF4 a également un rôle important au cours de la différenciation monocytaire. Un déficit en Klf4 entraîne un défaut de différenciation des cellules hématopoïétiques en monocytes Ly6C^{high} et le nombre de monocytes Ly6C^{low} est très réduit au niveau sanguin, médullaire et splénique (Kurotaki et al. 2013), contrairement aux granulocytes dont le nombre augmente (Feinberg et al. 2007). L'hyper-expression de Klf4 dans les CSH ou les CMP restreint la différenciation de ces progéniteurs dans le lignage monocytaire (Feinberg et al. 2007). La sur-expression de Klf4 au sein de progéniteurs porteurs d'un déficit de Spi.1/Pu-1 et Irf8 est suffisante pour rétablir la différenciation monocytaire (Feinberg et al. 2007).

d. MAFB et c-MAF

Enfin, il est à noter que MafB (*musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B*) et c-Maf sont fortement exprimés au sein des monocytes et des macrophages (Sieweke et al. 1996; Hegde et al. 1999), pouvant ainsi induire la différenciation monocytaire des progéniteurs myéloïdes (Gemelli et al. 2006).

3. Coopération entre les facteurs de transcription et les voies de signalisation cytokinique

Comme indiqué précédemment, le facteur de croissance CSF-1 et son récepteur CD115 (ou CSF-1R ou MCSF-R), ont un rôle crucial au cours de la monocytopoïèse. SPI-1/PU.1 active le promoteur proximal de *C-FMS* qui code pour CSF-1R (Reddy et al. 1994). Ceci explique pourquoi les progéniteurs murins déficients en *Spi-1/Pu.1* n'expriment pas le Csf-1R (DeKoter et al. 1998). Au sein des progéniteurs, SPI-1/PU.1 se fixe sur le promoteur proximal de *C-FMS*, permettant le recrutement des facteurs de transcription EGR, induisant sa forte expression dans les cellules plus matures. Au niveau des cellules déficientes en Spi-1/Pu.1, l'expression de *c-fms* est trop faible pour induire la différenciation macrophagique (DeKoter et al. 1998), indiquant qu'en l'absence de Spi-1/Pu.1, la signalisation *via* Csf-1r est insuffisante pour assurer la différenciation macrophagique.

L'IFN γ est une cytokine pro-inflammatoire agissant en recrutant les monocytes au cours des processus inflammatoires. Durant les processus infectieux, et plus largement inflammatoires, l'expression de Spi-1/Pu.1 et d'Irf8 augmente au sein des GMP de souris contrôles,

contrairement aux souris déficientes en $\text{IFN}\gamma$. De plus, la stimulation des GMP avec de l' $\text{IFN}\gamma$ résulte en une régulation positive de ces deux facteurs de transcription (de Bruin et al. 2012). L'interféron de type I (IFN-I) et son récepteur ont également un rôle important dans le recrutement des monocytes en situation inflammatoire. En effet, la perte d'expression du récepteur à l'IFN-I chez des souris induit une augmentation de la migration des granulocytes et une diminution du recrutement des monocytes lors d'une infection pulmonaire virale, à l'origine d'une majoration du risque de décès des souris (Seo et al. 2011). Les CSH n'exprimant pas ce récepteur ne se différencient pas en monocytes $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ alors que la population Ly6C^{int} est significativement plus présente au niveau de la moelle osseuse et du poumon infecté (Seo et al. 2011).

4. Le rôle de la vitamine D3 et de son récepteur

La $1\alpha,25$ dihydroxyvitamine D3 ($1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$) (VD3) est la forme métabolique active de la vitamine D3 (Carlberg and Polly 1998). Initialement synthétisée au niveau cutané à partir du 7-déshydrocholestérol, elle est ensuite prise en charge au niveau hépatique et rénal pour obtenir la forme physiologique $1\alpha,25$ dihydroxyvitamine D3 dont l'activité biologique passe par la fixation à son récepteur qui appartient à la famille des récepteurs nucléaires hormonaux (VDR : *vitamin D3 receptor*) (Issa et al. 1998). La VD3 est capable de promouvoir la différenciation monocyttaire à la fois des cellules leucémiques myéloblastiques dont HL-60 (Tagliafico et al. 2002), U-937 (Du et al. 2005) et des progéniteurs hématopoïétiques humains CD34^+ (Grande et al. 2002; Gemelli et al. 2008). Dans ces deux types cellulaires, la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ agit directement dans la régulation de *HOXA10* (*Homebox A10*), nécessaire au développement hématopoïétique et à l'implantation embryonnaire. Le traitement de la lignée myélomonocytaire U-937 avec la VD3 stimule l'expression de *HOXA10* (Du et al. 2005). Au niveau des progéniteurs hématopoïétiques humains CD34^+ , l'équipe de Sergio Ferrari a mis en évidence un domaine de liaison pour HOXA10 au niveau du promoteur de *MAFB*. La stimulation de ces cellules progénitrices par la vitamine D3 entraîne une augmentation des transcrits de *MAFB* et *HOXA10*, prouvant l'existence d'une cascade de transactivation entre VDR, HOXA10 et MAFB (Gemelli et al. 2008).

C. L'hétérogénéité des monocytes

Les monocytes sont phénotypiquement reconnaissables par leur expression de CD115 (ou MCSF-R ou CSF1-R) ainsi que de CX3CR1. Ils expriment à leur surface de nombreux récepteurs éboueurs ou « *scavenger* » qui reconnaissent des micro-organismes variés. En revanche, les monocytes sont aussi caractérisés par leur absence d'expression des marqueurs des cellules NK, des lymphocytes T et B et des PNN, respectivement Nkp-46, CD3, CD19 et CD15 (Auffray et al. 2009). Les monocytes sont capables de produire des formes réactives de l'oxygène, de l'oxyde nitrique, des cytokines telles que le TNF- α , l'IL-6, l'IL-10 et l'IL-1 β , permettant à l'organisme de lutter contre les pathogènes (Grage-Griebenow et al. 2001a). Initialement décrit comme une population cellulaire homogène, des données récentes ont démontré une importante hétérogénéité des monocytes.

1. Chez l'Homme

a. les différentes populations monocytaires humaines (Figure 12 et Tableau 3)

Au début des années 1980, différentes équipes décrivent l'existence de deux populations monocytaires humaines, dont la différence réside dans leurs caractéristiques fonctionnelles (Yasaka et al. 1981; Weiner and Mason 1984; Akiyama et al. 1985; Elias et al. 1985). La population majoritaire correspond à des monocytes de grande taille aux capacités phagocytaires élevées, pourvus également d'une activité myéloperoxydasique et de sécrétion d'ions superoxydes. La population minoritaire rassemble des monocytes de plus petite taille, dont l'activité peroxydasique est moins développée, mais dont les capacités de sécrétion d'IL-1 d'une part et de cytotoxicité dépendante de l'anticorps d'autre part sont importantes.

Par la suite, d'autres travaux ont distingué les différentes populations monocytaires humaines en fonction de leurs caractéristiques phénotypiques. Ainsi, le groupe de Ziegler-Heitbrock a identifié la population monocyttaire de petite taille décrite ci-dessus comme celle exprimant le CD16, pourvue de capacités de sécrétion de cytokines importantes (Passlick et al. 1989). La seconde population apte à la phagocytose exprime le CD14. Ainsi, les monocytes dits « classiques » CD14⁺CD16⁻ représentant 80 à 90% des monocytes circulants, expriment fortement le récepteur cytokinique CCR2 mais faiblement CX3CR1, et produisent *in vitro* majoritairement l'IL-10 plutôt que l'IL-1 ou le TNF- α en réponse au LPS

(lipopolysaccharide) (Ziegler-Heitbrock et al. 1992; Almeida et al. 2001). Leur phénotype ressemble à celui des monocytes Ly6C⁺ murins, même si les capacités de sécrétion de cytokines de ces derniers sont très développées (Serbina et al. 2008). Les analyses transcriptomiques vont en tout cas dans ce sens et mettent en équivalence les monocytes CD14⁺CD16⁻ humains avec les monocytes Ly6C⁺ murins (Ingersoll et al. 2010).

Plusieurs travaux sont allés plus loin à travers la démonstration que la population CD16⁺ est composée de deux sous-populations bien distinctes de par leur niveau d'expression de CD14 (Grage-Griebenow et al. 2001a; Zawada et al. 2011) et leurs fonctions (Ziegler-Heitbrock 2000; Grage-Griebenow et al. 2001b; Belge et al. 2002; Cros et al. 2010). Ainsi, la population CD14⁺CD16⁺ regroupe les monocytes dits « intermédiaires » et la population CD14^{dim}CD16⁺ les monocytes dits « non classiques ». Si ces différentes équipes s'accordent sur la différence d'expression de CD14, elles divergent sur les autres marqueurs phénotypiques d'une part et leurs fonctions d'autre part. Concernant CCR2, le niveau d'expression est toujours considéré comme faible dans les deux populations (Grage-Griebenow et al. 2001b; Zawada et al. 2011). Quant à CX3CR1, une équipe le trouve plus exprimé à la surface des monocytes « intermédiaires » (Grage-Griebenow et al. 2001b) et une autre à la surface des monocytes « non classiques » (Zawada et al. 2011). L'expression de CD32 (récepteur au fragment Fc) serait plus élevée à la surface des monocytes « intermédiaires » que des monocytes « non classiques » d'après les résultats de l'équipe de Martin Ernst (Grage-Griebenow et al. 2001b) et équivalente entre les deux populations selon ceux de Gunnar H. Heine (Zawada et al. 2011). Par ailleurs, les monocytes « intermédiaires » exprimeraient également CD206 (un marqueur macrophagique M2) et CCR5, expliquant respectivement leur différenciation préférentielle en macrophages de type M2 et leur rôle au cours de l'infection du VIH (virus de l'immunodéficience humaine) (Jaworowski et al. 2007). Concernant leurs capacités fonctionnelles, l'équipe de Martin Ernst a montré que les monocytes « intermédiaires » ont une activité de phagocytose et de production de TNF- α et d'IL-1 en réponse au LPS (Grage-Griebenow et al. 2001b). Les monocytes « non classiques » CD14^{dim}CD16⁺ ont une activité de phagocytose pauvre et ne produisent pas de TNF- α et d'IL-1 en réponse au LPS (Ziegler-Heitbrock 2000; Belge et al. 2002). Les travaux de Frédéric Geissmann retrouvent cette faible capacité de phagocytose, de production de radicaux oxygénés après stimulation par le LPS des monocytes « non classiques ». Toutefois, son équipe met en évidence une production de TNF- α et d'IL-1 β (Cros et al. 2010). Les analyses transcriptomiques les associent aux monocytes Ly6C⁻ murins (Ingersoll et al. 2010). Ces monocytes CD16⁺ se différencient

majoritairement en cellules dendritiques, contrairement aux monocytes classiques CD14⁺ à l'origine de la formation des macrophages (Randolph et al. 2002).

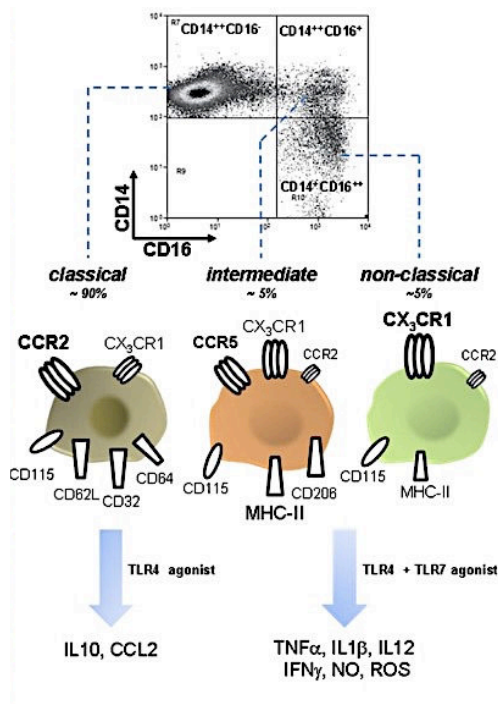


Figure 12 : Les trois populations de monocytes chez l'Homme selon l'expression de CD14 et CD16 (adapté de Zimmermann *et al.*, Front.Physiol., 2012)

b. Leurs rôles dans les pathologies humaines

Divers travaux ont décrit l'expansion des monocytes CD16⁺ au cours de pathologies humaines telles que la polyarthrite rhumatoïde (Kawanaka et al. 2002), l'athérosclérose et les insuffisances coronariennes (Schlitt et al. 2004). Ces monocytes ont également été impliqués au cours de maladies infectieuses comme le VIH (Thieblemont et al. 1995), l'érysipèle (Horelt et al. 2002) et les sepsis bactériens notamment à bacilles Gram négatif (Fingerle et al. 1993; Herra et al. 1996). La guérison de l'infection se traduit par une diminution du nombre de ces monocytes (Horelt et al. 2002). Au cours des pathologies hépatiques dont la cirrhose de stade Child C, les monocytes CD16⁺ sont aussi significativement augmentés (Zimmermann et al. 2010).

2. Chez la Souris (Figure 13 et Tableau 3)

Les monocytes murins sont identifiés grâce à l'expression de CD115, F4/80, CD11b et Ly6C, un antigène présent de façon variable sur la membrane monocytaire grâce à une ancre glycosylphosphatidylinositol (Geissmann et al. 2003; Geissmann et al. 2008).

a. Les monocytes CD115⁺Ly6C⁺

- **Leur rôle au cours de l'inflammation**

Les monocytes CD115⁺Ly6C⁺, dont l'équivalent phénotypique humain correspond aux monocytes CD14⁺, sont appelés monocytes classiques pro-inflammatoires et sont recrutés au cours des mécanismes inflammatoires ou infectieux afin de produire de grandes quantités de cytokines telles que le TNF- α , l'IFN γ et l'IL-1 (Geissmann et al. 2003; Sunderkotter et al. 2004; Serbina and Pamer 2006; Serbina et al. 2008). Ces monocytes dérivent du progéniteur monocyttaire commun (cMoP, *common Monocyte progenitor*) (Hettinger et al. 2013). Ils ne sont pas seulement présents dans le sang mais également au sein de divers tissus tels que la peau, la rate, les poumons ou les ganglions (Jakubzick et al. 2013; Tamoutounour et al. 2013). En conditions inflammatoires, ces monocytes se différencient en cellules dendritiques et en macrophages. Le rôle des monocytes au cours des réactions inflammatoires a été étudié grâce à un modèle murin porteur d'une infection à germe intracellulaire, la bactérie *Listeria monocytogenes* (Serbina et al. 2003b; Sunderkotter et al. 2004). Ainsi, au cours d'une infection, les monocytes Ly6C⁺ sortent massivement de la moelle osseuse sous l'effet de CCR2 et se différencient, *via* un mécanisme dépendant de MyD88, en cellules productrices de TNF- α et d'oxyde nitrique (NO), régulant par ailleurs positivement les antigènes CD80, CD86, CD11c et CMHII (Serbina et al. 2003a; Tsou et al. 2007). Ces cellules ont par la suite été appelées les « Tip-DC » pour « *TNF- α /iNOS-producing dendritic cell* », c'est-à-dire cellules dendritiques productrices de TNF- α et iNOS (Serbina et al. 2003b). Les cellules dendritiques « Tip-DC » sécrètent rapidement le TNF- α avant de migrer au niveau des follicules spléniques où elles génèrent de grandes quantités d'oxyde nitrique. Les souris déficitaires en CCR2 voient ainsi leur nombre de « Tip-DC » réduit de façon conséquente, ce qui provoque une moindre maîtrise de l'infection à *Listeria monocytogenes* (Serbina et al. 2003b). Néanmoins, chez ces mêmes souris, la réponse immunitaire T n'est pas altérée, suggérant que le rôle principal de ces cellules dendritiques dérivées des monocytes soit anti-bactérien et non un contrôle de la réponse lymphocytaire T (Serbina et al. 2003b).

- Leur rôle au cours des processus néoplasiques

Des cellules présentant un phénotype proche de celui des monocytes, exprimant CD115, Ly6C et CD11b, sont capables de proliférer dans la rate de souris porteuses de tumeurs (Movahedi et al. 2008). Ces cellules ont été dénommées « cellules myéloïdes suppressives » (MDSC, *myeloid-derived suppressor cells*) puisqu'elles possèdent aussi la propriété de lymphosuppression T. En effet, *via* la production d'oxyde nitrique et de formes réactives de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*), ces MDSC inhibent la réponse T spécifique de l'antigène et particulièrement la réponse lymphocytaire T CD8 (Bronte et al. 2000; Kusmartsev et al. 2004; Gallina et al. 2006; Huang et al. 2006). Cela suggère que les monocytes CD115⁺Ly6C⁺ peuvent se différencier soit en MDSC pour assurer la lymphosuppression T soit en « Tip-DC » pour à l'inverse renforcer la réponse T.

b. Les monocytes CD115⁺Ly6C⁻

Ces monocytes dits « non classiques » expriment faiblement CCR2 et fortement CX3CR1 (Geissmann et al. 2003; Sunderkotter et al. 2004). Ils ont été nommés « monocytes résidents » chez la Souris car de demi-vie plus longue et résidant dans les vaisseaux sanguins (Geissmann et al. 2003). Leur rôle serait de « patrouiller » dans les vaisseaux sanguins, se liant à l'endothélium vasculaire grâce à l'intégrine $\beta 2$ LFA-1 et au récepteur de cytokine CX3CR1. En dehors de toute situation inflammatoire, leur extravasation est un phénomène rare (Auffray et al. 2007). Mais dès lors qu'un processus infectieux ou inflammatoire survient, ces monocytes sont les premiers à intervenir sur le site touché, sécrétant du TNF- α , mais de façon fugace puisque les monocytes Ly6C⁺ prennent rapidement le relai, devenant les principales cellules productrices de TNF- α . Les monocytes Ly6C⁻ engagent par la suite un programme de différenciation macrophagique *via* une activation transcriptionnelle des gènes *MafB*, *cMaf*, *Egr-1*, *Egr-2* et *Egr-3* (Martinez et al. 2006) alors que les monocytes Ly6C⁺ tendent à se différencier en cellules dendritiques faisant intervenir RelB et Spi-1/Pu.1 (Auffray et al. 2007). Plusieurs auteurs ont confirmé ces résultats en montrant que deux populations différentes de monocytes sont recrutées en cas d'inflammation au niveau myocardique (Nahrendorf et al. 2007) et pulmonaire (Landsman et al. 2007). Ludovic Arnold et ses collaborateurs montrèrent au contraire que la population Ly6C⁻ donne naissance à la population Ly6C⁺ au niveau musculaire (Arnold et al. 2007).

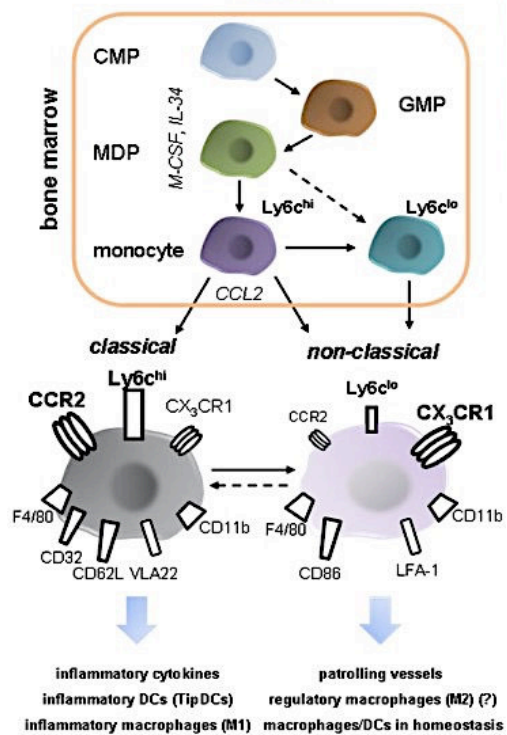


Figure 13 : Les deux populations de monocytes chez la Souris, selon le niveau d'expression de Ly6C (adapté de Zimmermann *et al.*, Front.Physiol., 2012)

	Homme	Souris
Monocytes classiques, proinflammatoires 90%	Phénotype	
	CD14 ⁺ CD16 ⁻ CCR2 ^{high} CX3CR1 ^{low}	CD115 ⁺ Ly6C ^{high} CCR2 ^{high} CX3CR1 ^{low}
	Fonctionnalité	
	Sécrétion IL-10 > TNF- α et IL-1	Sécrétion IL-1, TNF- α , IFN γ
Monocytes intermédiaires 5%	Phénotype	
	CD14 ⁺ CD16 ⁺ CCR2 ^{low} CX3CR1 ^{high} CD32 ⁺ CD64 ⁺	
	Fonctionnalité	
	Sécrétion TNF- α , IL-1 et phagocytose	
Monocytes non classiques, résidents 5%	Phénotype	
	CD14 ^{dim} CD16 ⁺ CD32 ⁻	CD115 ⁺ Ly6C ^{low} CCR2 ^{low} CX3CR1 ^{high}
	Fonctionnalité	
	Pas de phagocytose ni de sécrétion de cytokines, « patrouilleur » dans les vaisseaux	

Tableau 3 : Les différentes populations de monocytes chez l'Homme et la Souris

III. Les macrophages

A. L'origine des macrophages

Ces cellules faisant partie du système des phagocytes mononucléés sont des cellules de l'immunité innée, participant à l'homéostasie cellulaire en phagocytant les cellules apoptotiques et produisant des facteurs de croissance et des cytokines pro-inflammatoires.

Le système phagocytaire a été décrit pour la première fois par Illya Metchnikoff en 1897 (Gordon 2008), devenu le « père de l'immunité innée ». Ce système regroupait les macrophages (du grec « gros mangeur ») et les microphages (du grec « petit mangeur ») actuellement appelés polynucléaires neutrophiles. De nombreux synonymes ont été donnés aux macrophages au cours de la première moitié du XX^{ème} siècle, puis Ralph van Furth, James Hirsch et Zanvil Cohn ont, à la fin des années 1960, caractérisé et défini les phagocytes mononucléés. Ce système regroupait les monocytes et macrophages avec le postulat que les macrophages sont issus des monocytes (van Furth et al. 1972). Au cours des années 1970, Steinman décrit la cellule dendritique (Steinman and Cohn 1973; Steinman and Witmer 1978) puis van Furth les intégra parmi le système des phagocytes mononucléés (van Furth 1980). C'est donc à compter des années 1980 que ce système a réuni les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. Ces trois types cellulaires étaient distingués exclusivement à travers leur morphologie, leur fonction et leur origine. Le postulat initial considérait que les cellules constituant ce système dérivent uniquement des monocytes sanguins. Mais trois événements sont depuis venus remettre en cause cette théorie. Le premier correspond à la mise en évidence de l'auto-renouvellement des macrophages, indépendamment des monocytes et de l'existence d'un précurseur embryonnaire (Naito et al. 1997; Alliot et al. 1999; Ginhoux et al. 2010; Hoeffel et al. 2012; Schulz et al. 2012; Williams et al. 2013; Hashimoto et al. 2013). Le second tient au fait que les monocytes proviennent d'un précurseur appelé progéniteur monocyttaire commun (Hettinger et al. 2013). Les monocytes peuvent rejoindre les tissus et maintenir leur phénotype à l'état basal (Jakubzick et al. 2013) mais peuvent également donner naissance à des cellules dont les fonctions dépendront à la fois du tissu et du microenvironnement dans lequel elles résideront (Tamoutounour et al. 2013). Le troisième événement concerne les cellules dendritiques classiques et plasmacytoïdes provenant d'un précurseur dendritique commun (CDP, *common dendritic cell precursor*), contrairement aux monocytes et macrophages (Naik et al. 2007; Onai et al. 2007). L'ensemble de ces données plus récentes montre donc que le système des

phagocytes mononucléés n'est pas restreint à des cellules dérivées des monocytes mais regroupe bel et bien trois types cellulaires dont l'ontogénie leur est propre : les cellules dendritiques dérivées du précurseur CDP, les macrophages d'origine embryonnaire et les cellules dérivées des monocytes (Guilliams et al. 2014).

B. Les différentes populations de macrophages (Figure 14)

Les macrophages représentent une population cellulaire hétérogène, du fait d'une grande diversité dans leur morphologie, leur fonction et leur localisation tissulaire (Hume 2012). Ainsi, selon leur localisation anatomique, sont distingués les histiocytes du tissu conjonctif, la microglie au niveau cérébral, les cellules de Küpffer hépatiques, les ostéoclastes responsables du remodelage osseux et les macrophages alvéolaires pulmonaires.

Le modèle canonique de l'hématopoïèse stipule que toute cellule débute son développement au stade embryonnaire, au 8^{ème} jour, à partir de l'ectoderme du sac vitellin. Ce système primitif est suivi par l'hématopoïèse qui se déroule dans le foie fœtal, initialement à partir des progéniteurs hématopoïétiques du sac vitellin puis de la région aorte-gonade-mésonephros. Puis l'hématopoïèse du foie fœtal décline et laisse place à l'hématopoïèse médullaire : cette hématopoïèse définitive est la source des monocytes circulants, desquels dérivent les macrophages tissulaires (Geissmann et al. 2010).

Depuis lors, l'origine des macrophages a été précisée et il semblerait que les macrophages cérébraux appelés microglie sont issus de progéniteurs du sac vitellin alors que les cellules de Langherans correspondant aux macrophages de la peau, proviennent à la fois du sac vitellin et du foie fœtal (Ginhoux et al. 2010; Hoeffel et al. 2012). La majorité des macrophages tissulaires, caractérisés par le marqueur glycoprotéique F4/80 (cutanés, spléniques, pancréatiques, hépatiques, cérébraux et pulmonaires) émanent de progéniteurs du sac vitellin. Certains macrophages ont une double origine : les macrophages rénaux et pulmonaires sont originaires à la fois du sac vitellin (F4/80^{high}) et de la moelle osseuse (F4/80^{low}). Les macrophages F4/80^{low} sont renouvelés de façon continue par les progéniteurs médullaires (Schulz et al. 2012). Cela indique donc l'existence de trois sources de macrophages chez la Souris, survenant à différents stades de développement et persistant jusqu'à l'âge adulte. Malgré cette origine embryonnaire commune, l'analyse de l'expression génique des macrophages a mis en évidence la grande diversité de ces cellules (Gautier et al. 2012b), stipulant que chaque population macrophagique est spécifiquement adaptée à son tissu de résidence.

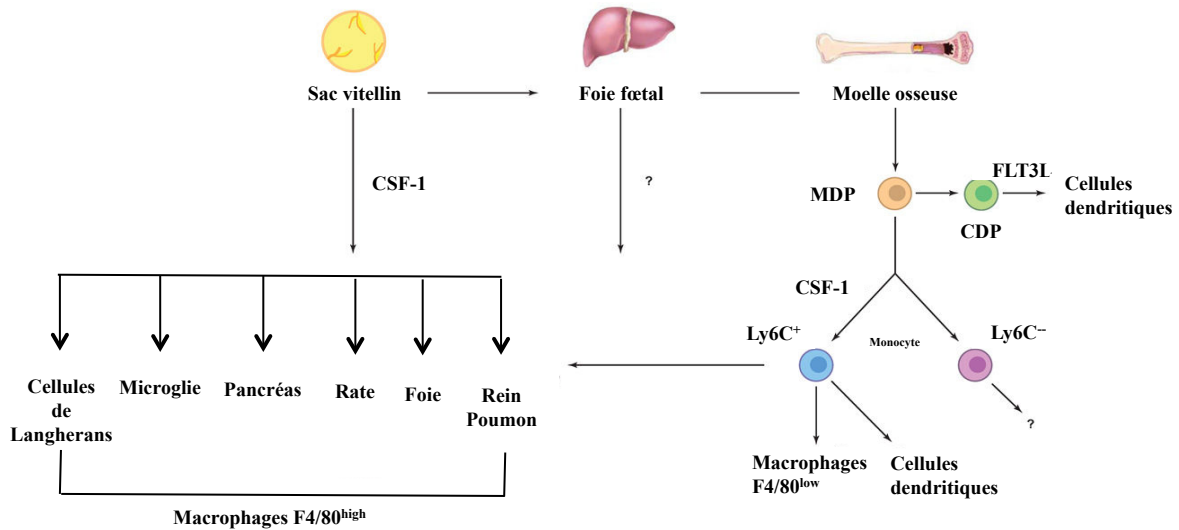


Figure 14 : Les différentes populations macrophagiques et leurs origines (adapté de Wynn *et al.*, Nature, 2013)

C. Les fonctions macrophagiques

1. Généralités

Les macrophages représentent une première barrière de défense contre les agents pathogènes, d'une part en les phagocytant et d'autre part en présentant leurs antigènes aux lymphocytes T, faisant de ces cellules des cellules présentatrices de l'antigène (CPA) (Gordon and Martinez 2010). Dans chaque tissu, les macrophages acquièrent un phénotype spécifique. Ils ont été classés en deux catégories, les macrophages de type M1, appelés macrophages « classiques » et les macrophages de type M2 dits « alternatifs » (Biswas and Mantovani 2010). Au cours d'un processus inflammatoire aigu, se produit une activation macrophagique de type M1 *via* les TLR (*Toll Like Receptor*) et les cytokines Th1 (IFN- γ). Cela détermine leurs capacités à tuer et phagocyter les agents pathogènes, induire la production de cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-1 β , le TNF- α ou l'IL-12, les formes réactives de l'oxygène et présenter les antigènes des agents pathogènes aux lymphocytes T grâce au complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) (Biswas and Mantovani 2010). Les cytokines Th2 comme l'IL-4 ou l'IL-13 stimulent par ailleurs les monocytes-macrophages sur un mode « M2 », c'est-à-dire leur conférant des capacités de production de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 plus importantes, contrastant avec une moindre production de

cytokines pro-inflammatoires. Ces macrophages contrôlent positivement les récepteurs de surface « éboueurs » tels que le CD206 (récepteur au mannose) ou le CD163. Cela facilite l'arrêt du processus inflammatoire et promeut la réparation tissulaire (Biswas and Mantovani 2010). Par ailleurs, les macrophages des tissus sains arborent souvent un phénotype « mixte » M1-M2.

2. La phagocytose assurée par les macrophages garantit l'homéostasie cellulaire

Les macrophages participent à l'homéostasie cellulaire en intervenant au cours de l'érythropoïèse : les érythroblastes en cours de maturation perdent leur noyau qui est digéré par les macrophages. En leur absence, l'érythropoïèse est bloquée et l'issue est létale (Kawane et al. 2001). Autre témoin de cette fonction dans l'homéostasie cellulaire, les macrophages phagocytent les granulocytes et les érythrocytes au niveau splénique et hépatique et en l'absence de cette phagocytose, se développent une hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles, une splénomégalie ainsi qu'une perte de poids (Gordy et al. 2011). La phagocytose apparaît ainsi centrale dans la fonction des macrophages.

3. Les macrophages participent à l'angiogenèse

En témoigne leur rôle au cours du développement oculaire. En période *post-partum*, les macrophages permettent la régression de la vascularisation hyaloïde. En délivrant un signal de mort cellulaire *via* WNT7B aux cellules endothéliales vasculaires, les macrophages évitent ainsi l'hypervascularisation (Rao et al. 2007). En effet, au cours du développement de la vascularisation rétinienne, les macrophages synthétisent WNT5A et WNT11, induisant l'expression du récepteur au VEGF (Stefater et al. 2011). Les macrophages participent également à l'angiogenèse cérébrale, au niveau du rhombencéphale, en provoquant les anastomoses vasculaires (Fantin et al. 2010). En outre, ils participent à la lymphangiogenèse (Gordon et al. 2010).

4. Les macrophages influencent le développement cérébral

Appelés microglie, les macrophages cérébraux dépendent de la voie de signalisation du CSF-1R. En son absence, se développent des anomalies cérébrales structurelles (Erblich et al. 2011). Le CSF-1 et l'IL-34 sont tous deux exprimés par les neurones bien que l'IL-34 soit la

principale cytokine responsable de la viabilité et de la différenciation de la microglie (Ginhoux et al. 2010; Nandi et al. 2012). Les anomalies structurelles cérébrales, les déficits de l'olfaction ainsi que les désordres hypothalamiques des souris présentant un déficit en CSF-1 attestent du rôle de la microglie dans l'équilibre du fonctionnement cérébral (Pollard 2009; Erbllich et al. 2011).

5. Les macrophages interviennent dans l'homéostasie métabolique

Au cours des processus infectieux, l'activation des macrophages induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-6, l'IL-1 β , à l'origine d'une résistance à l'insuline qui limite le stockage des éléments nutritifs (Chawla et al. 2011; Odegaard and Chawla 2013).

6. Le rôle des macrophages au sein de la niche hématopoïétique

Les CSH résident dans une niche hématopoïétique médullaire régulée par le système nerveux sympathique. L'équipe de Paul Frenette a décrit trois populations de phagocytes mononucléés dans la niche hématopoïétique en fonction de l'expression de Gr1, CD115, F4/80 et CD169. Elles incluent les monocytes Gr1^{high}, Gr1^{low} et les macrophages. Cette équipe est parvenue après des injections de clodronate liposomal à réduire le nombre de phagocytes mononucléés dans la niche hématopoïétique et à induire la mobilisation des CSH en dehors de celle-ci. Ils ont prouvé que ces cellules mononucléées régulent les cellules Nestin⁺ responsables du maintien des CSH dans la niche hématopoïétique. Ce sont les macrophages CD169⁺ qui induisent la synthèse de CXCL12 *via* une protéine qu'ils n'ont pu identifier. Cela explique que cette mobilisation des CSH dans le sang se soit traduite par une diminution du CXCL12 (Chow et al. 2011). Une autre équipe de recherche, celle de Matthias Nahrendorf a par la suite montré que les macrophages sont responsables du maintien de la CSH dans la rate *via* VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*), faisant des macrophages des cellules essentielles à la myélopoïèse extramédullaire. En effet, une stratégie d'inactivation génique a permis à cette équipe d'inhiber le CSF1R, empêchant la maturation des macrophages au niveau splénique, ayant pour conséquence la baisse d'expression de VCAM-1 pour finalement compromettre la rétention des CSH dans la rate. Là encore, ce sont les macrophages exprimant le CD169 qui sont impliqués dans cette rétention des CSH (Dutta et al. 2015).

7. Les macrophages ont un rôle au cours de l'érythropoïèse

Abordés dans le précédent chapitre comme ayant un rôle dans la rétention des CSH dans la moelle osseuse et la rate, les macrophages CD169⁺ interviennent également au cours de l'érythropoïèse. Ainsi, la déplétion médullaire de ces macrophages entraîne une diminution des érythroblastes de la moelle osseuse. Au cours de la polyglobulie primitive de Vaquez Jak2^{V617F}, syndrome myéloprolifératif caractérisé par une érythropoïèse non régulée, la diminution de cette population macrophagique normalise le compartiment érythroïde. De même, la chute du nombre de ces macrophages est responsable d'altérations du rétablissement de l'érythropoïèse lors d'une anémie hémolytique ou d'une hémorragie (Chow et al. 2013).

8. Les macrophages au cours de l'oncogenèse

Les macrophages associés aux tumeurs appelés TAM (*tumor associated macrophages*) sont dérivés des monocytes sanguins recrutés sur les sites tumoraux *via* des chimiokines telles que CCL2 (Franklin et al. 2014). D'un point de vue phénotypique, il s'agit de monocytes qui, recrutés sur un site tumoral, acquièrent l'expression du CMH II et perdent celle du Ly6C (Shand et al. 2014). Déviés de leur fonction de protection, ils vont avoir dans cette situation un rôle pro-tumoral : ils stimulent la migration, la prolifération et la survie des cellules tumorales facilitant ainsi le développement des métastases (Qian and Pollard 2010). Cette fonction passe par la sécrétion de molécules angiogéniques telles que les membres de la famille VEGF incluant le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-8, le PDGF et le FGF (*fibroblast growth factor*) (Qian and Pollard 2010). Ils favorisent ainsi l'angiogenèse, donc la vascularisation tumorale, majorant les capacités des cellules néoplasiques à métastaser (Qian and Pollard 2010). Divers modèles murins ont révélé le recrutement de monocytes sur un site tumoral par des cytokines sécrétées à la fois par les cellules stromales et les cellules malignes. Ces cytokines sont le MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*), le CSF-1 et le CXCL12 (Murdoch et al. 2008). Des études cliniques ont confirmé cette capacité des macrophages à promouvoir l'expansion tumorale. Ces travaux montrent une densité intra-tumorale en macrophages élevée, associée à une prolifération vasculaire et donc métastatique plus importante, expliquant un pronostic péjoratif (Clear et al. 2010). Il a été proposé que les macrophages de type TAM seraient porteurs d'un phénotype M2, expliquant leur capacité à provoquer la croissance et la vascularisation tumorale (Mantovani et al. 2002). Cela a été conforté par l'étude de l'expression du marqueur CD163 dans les macrophages au cours de

néoplasies humaines (Heusinkveld and van der Burg 2011). Les TAM de type M2 résident à la fois dans les régions tumorales hypoxiques et dans les zones périvasculaires (Mazzieri et al. 2011). Ainsi, une population de TAM associés aux vaisseaux, appelée TEM (*TIE2-expressing monocytes/macrophages*), participe à l'angiogenèse (De Palma et al. 2005) et affiche un phénotype de type M2 (CD206⁺CD163⁺CMHII^{low}) (Squadrito and De Palma 2011). Les TAM sont aussi doués de fonctions immunosuppressives, comme les MDSC que nous aborderons ultérieurement. Porteurs d'une activité enzymatique de type arginase 1, les TAM privent les lymphocytes T d'un acide aminé semi-essentiel, la L-arginine (Rodriguez et al. 2004). Ils facilitent l'apoptose des lymphocytes T en exprimant à leur surface les molécules PD-L1 (*programmed death-ligand 1*) (Kuang et al. 2009) et B7-H1 (*B7 Homolog 1*) (Kondo et al. 2010). Ces molécules ont pour récepteur PD-1, situé à la surface des lymphocytes T. La liaison du ligand à son récepteur induit l'apoptose du lymphocyte T. Les anticorps anti-PD-1 utilisés dans la prise en charge de différents cancers (mélanomes malins, maladies de Hodgkin en rechute par exemple) induisent ainsi le rétablissement de l'immunité antitumorale en levant l'inhibition des lymphocytes T. Les TAM sont au même titre que les MDSC des cibles thérapeutiques intéressantes pour rétablir l'immunité anti-tumorale. Deux abordos sont possibles : la déplétion et la « ré-éducation » ou « re-programmation » de cette population macrophagique, respectivement par l'utilisation d'anticorps anti-CSF-1R et l'administration de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN α . Cela rétablit l'immunité anti-tumorale en détruisant les TAM. La seconde méthode est plus séduisante puisqu'elle rétablit les capacités des TAM à stimuler le système immunitaire (Ostuni et al. 2015). Les anticorps anti-CSF-1R ont été utilisés dans un modèle murin de cancer mammaire et augmentent l'efficacité de la chimiothérapie (Ries et al. 2014). Chez l'Homme, une étude de phase I a prouvé leur efficacité au cours des tumeurs synoviales (West et al. 2006) et des glioblastomes (Pyonteck et al. 2013). L'utilisation d'IFN α a été rapportée dans un modèle murin de cancer du sein. Une réduction significative de la taille tumorale a été notée, liée à l'activation des lymphocytes T et NK par l'IFN α (Escobar et al. 2014). Une autre voie possible de thérapeutique dirigée contre les TAM est celle consistant à inhiber le recrutement des monocytes sur les sites tumoraux puisque ce sont les précurseurs des TAM, en interférant sur l'axe CCL2/CCR2 grâce à un anticorps. Cela a été probant au cours de cancers du sein métastasés au niveau pulmonaire (Qian et al. 2011).

Les TAM ne sont pas les seuls macrophages à tenir une place centrale au cours de l'oncogenèse. Les macrophages CD169⁺ interviennent par exemple au cours du carcinome

colorectal (CCR). L'équipe de recherche de Motohiro Takeya a étudié par immunohistochimie l'expression du CD169 à la surface des macrophages des ganglions régionaux de CCR. Elle a montré une survie globale significativement meilleure chez les patients ayant un nombre de macrophages CD169⁺ élevé dans leurs ganglions. Au sein des ganglions, ces macrophages sont en contact direct avec les lymphocytes T CD8⁺ exprimant aussi le CD43, un ligand du CD169. Il existe dans leur étude une corrélation significative entre le nombre de macrophages CD169⁺ et les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺, suggérant que ces macrophages ont la capacité de promouvoir la réponse immune antitumorale passant par les lymphocytes T CD8⁺. Ainsi, ce marqueur CD169 est intéressant pour préciser le pronostic des patients atteints de CCR (Ohnishi et al. 2013).

9. Les macrophages et les maladies auto-immunes

Enfin, les macrophages interviennent au cours de nombreuses pathologies inflammatoires et auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (maladie de Crohn, rectocolite hémorragique), en étant la source de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IL-18, IL-23, TNF- α), responsables de l'état inflammatoire chronique observé (Kamada et al. 2008).

D. La différenciation macrophagique

1. Le CSF-1 et son récepteur, le CSF-1R

Le CSF-1 et son récepteur (CSF-1R ou CD115 ou M-CSFR) ont une place centrale au cours de la monocytopoïèse ainsi que la différenciation macrophagique. Le CSF-1R est un récepteur de type tyrosine kinase transmembranaire exprimé par de nombreuses, si ce n'est toutes, les cellules phagocytaires. Il est codé par le proto-oncogène *c-FMS*. Les souris déficientes en *Csf-1r* présentent une monocytopénie majeure ainsi qu'une diminution importante du nombre de macrophages (Dai et al. 2002). Ce récepteur composé de trois domaines, extra-cellulaire, transmembranaire et intra-cellulaire, fait partie de la superfamille des immunoglobulines. Ses ligands se fixent sur sa partie extracellulaire. Son domaine intracellulaire composé de résidus tyrosine permet la transduction du signal, faisant intervenir différentes voies de signalisation. La fixation du CSF-1 à son récepteur induit l'activité kinase de celui-ci, provoquant une auto-phosphorylation des résidus tyrosine de sa partie intra-cellulaire. S'ensuit une dimérisation

covalente du récepteur par des ponts disulfures, avec pour conséquence une nouvelle vague de phosphorylation de résidus tyrosine et l'activation consécutive des voies de signalisation. La voie PI3K/AKT/mTOR (*phosphatidylinositol-3-kinase/proteine kinase B/mammalian target of rapamycin*) est impliquée dans la survie cellulaire. La voie RAS/RAF/MEK/ERK (*rapidly accelerated fibrosarcoma/mitogen-activated protein kinase/ERK Kinase/extracellular-signal-regulated kinase*) intervient dans la prolifération et la différenciation cellulaire. Enfin, la voie Src est impliquée dans les modifications du cytosquelette permettant l'adhérence cellulaire, les capacités de migration et de phagocytose (Pixley and Stanley 2004).

Le phénotype des souris déficientes pour Csf-1 (souris *Csf-1^{op/op}*) est moins marqué, confirmant que cette cytokine n'est pas le seul ligand de CSF-1R. En effet, l'IL-34 a été décrite comme second ligand de ce récepteur (Lin et al. 2008). Ce phénotype associe retard de croissance, troubles de la fertilité, défauts de différenciation ostéoclastique et réduction du nombre de macrophages (Begg et al. 1993). Le phénotype présenté par les souris n'exprimant pas le Csf-1r étant proche de celui des souris sans la cytokine Csf-1, cela laisse supposer que cette cytokine a un seul récepteur (Chitu and Stanley 2006). Cependant, les souris n'exprimant pas le Csf-1r possèdent tout de même des macrophages, notamment au niveau splénique, ce qui indique que des facteurs de croissance autres que le CSF-1 agissent sur la production des macrophages. C'est le cas du GM-CSF et de l'IL-3. Néanmoins, les souris présentant un déficit de ces cytokines n'ont pas de diminution notable de leur population macrophagique excepté la population alvéolaire (Pollard 2009). Le GM-CSF semble être synthétisé en situation de stress et ne pas être présent à l'état basal, contrairement au CSF-1 (Hamilton and Achuthan 2013). La protéine VEGF α (*vascular endothelium growth factor α*) peut compenser le CSF-1 au cours de l'ostéoclastogénèse, faisant de cette protéine une candidate possible à la suppléance du CSF-1 (Niida et al. 1999).

2. Les facteurs de transcription

a. Spi-1/PU.1

La différenciation monocyto-macrophagique fait intervenir de nombreux facteurs de transcription dont le plus important est Spi-1/PU.1, appartenant à la famille des protéines ETS (*E-twenty six*). La perte d'expression de ce facteur entraîne une déplétion notable du nombre de macrophages, y compris ceux issus du sac vitellin (Schulz et al. 2012). Les cellules

souches embryonnaires porteuses d'une délétion de ce gène sont incapables de se différencier en macrophages *in vitro*, confirmant le rôle clef de Spi-1/Pu.1 au cours de la différenciation macrophagique (Henkel et al. 1996). Deux équipes ont par ailleurs étudié les conséquences de la délétion globale de ce gène chez la Souris. Elle se traduit par une mortalité embryonnaire tardive voire post-natale au décours d'une septicémie. Le décès des souris est secondaire à l'absence de monocytes, de macrophages, de polynucléaires neutrophiles et de lymphocytes B et T (Scott et al. 1994; McKercher et al. 1996). Ainsi, ce gène intervient à différents niveaux de la myélopoïèse.

b. KLF4

KLF4 est aussi un facteur de transcription important au cours de la différenciation macrophagique. Son expression est induite par Spi-1/PU.1. Son hyperexpression au sein des cellules HL-60 leur confère des caractéristiques de monocytes matures. A l'inverse, son inhibition est responsable d'un blocage de la différenciation monocyttaire. KLF4 se lie au promoteur du gène codant pour CD14 afin d'induire sa transcription (Feinberg et al. 2007). La surexpression de *Klf4* permet de réorienter les progéniteurs myéloïdes *Spi-1/Pu.1*^{-/-} vers une voie de différenciation monocyto-macrophagique alors qu'un déficit en *Klf4* engage le progéniteur vers un destin granulocytaire (Feinberg et al. 2007). KLF4 est responsable de la polarisation des macrophages M1, pro-inflammatoires, *versus* macrophages M2, anti-inflammatoires (Liao et al. 2011). En effet, l'expression de ce facteur de transcription est induite dans les macrophages M2 et réprimée dans les M1 (Liao et al. 2011). KLF4 coopère avec STAT6 pour induire le programme M2 et inhiber le programme M1 (Liao et al. 2011). Les macrophages porteurs d'un déficit d'expression de KLF4 présentent une augmentation de l'expression des gènes pro-inflammatoires, une majoration de leur activité bactéricide et de production de NO (Liao et al. 2011).

c. MAFB

Facteur de transcription appartenant à la famille bZip (*basic region/leucine zipper*) MAFB est exprimé par les monocytes et les macrophages (Sieweke et al. 1996 ; Gemelli et al. 2006) et voit son expression augmenter lors de la différenciation des progéniteurs myéloïdes en macrophages, faisant de cette protéine un inducteur de la différenciation macrophagique (Gemelli et al. 2006). La surexpression de *MAFB* induit la différenciation macrophagique de

cellules hématopoïétiques progénitrices humaines CD34⁺. Ainsi, les cellules ayant un taux élevé de MAFB forment des progéniteurs monocytaires CFU-M au détriment des progéniteurs érythroïdes CFU-E et BFU-E. De plus, l'expression des gènes intervenant dans la différenciation monocyto-macrophagique (gènes de maturation et de fonction macrophagique) est augmentée, alors que celle des gènes de signature érythroïde est diminuée (Gemelli et al. 2006). Déjà une décennie auparavant, l'équipe de Mickaël Siewecke avait montré que MAFB inhibe la différenciation érythroïde en se liant au domaine de liaison à l'ADN de ETS1, réprimant ainsi son rôle d'activateur transcriptionnel des gènes érythroïdes (Siewecke et al. 1996). En régulant positivement le promoteur de *c-fms*, MafB est également nécessaire au maintien de la prolifération des macrophages tissulaires (Geissmann et al. 2010). Youssef Bakri et ses collègues ont par ailleurs montré que l'équilibre Spi-1/Pu.1-MafB intervient dans le destin des progéniteurs myéloïdes du Poulet pour leur différenciation en cellules dendritiques ou en macrophages (Bakri et al. 2005). *Spi-1/Pu.1* inhibe *MafB* en se fixant à son promoteur, empêchant l'activité transcriptionnelle de MafB et subséquemment la différenciation macrophagique, promouvant au contraire la différenciation en cellules dendritiques. Ainsi, la répression de MafB et une expression élevée de Spi-1/Pu.1 sont nécessaires pour la différenciation dendritique alors qu'un taux élevé de MafB et modéré de Spi-1/Pu.1 est requis pour la différenciation macrophagique (Bakri et al. 2005).

d. c-MAF

Membre de la même famille de facteurs transcriptionnels b-Zip, c-MAF intervient également au cours de la différenciation macrophagique. En effet, son expression ectopique dans les lignées cellulaires HL-60 et U-937 amplifie la différenciation macrophagique (Hedge et al. 1999). Il réprime l'activité transcriptionnelle de ETS1, inhibant ainsi la différenciation érythroïde (Hedge et al. 1999).

c-MAF et MAFB agissent sur la réponse cellulaire au CSF-1 (Aziz et al. 2006; Sarrazin et al. 2009) et stimulent la différenciation monocyttaire (Tillmanns et al. 2007). Athar Aziz et ses collaborateurs ont montré que ces facteurs de transcription participent à la transition entre la sortie du cycle cellulaire et la différenciation terminale macrophagique. En effet, les leucocytes doublement déficients en MafB et c-Maf (Maf-DKO) forment en présence de CSF-1 des colonies monocytaires et macrophagiques capables d'auto-renouvellement, qui expriment Mac-1, F4/80 et CD115. Ces cellules entrent en cycle en réponse au CSF-1,

contrairement aux cellules contrôles. Les cellules issues de la différenciation des monocytes ont un phénotype de macrophages, porteurs de fonctions macrophagiques dont la sécrétion de NO en réponse au LPS ou la phagocytose. C'est l'augmentation d'expression de Klf4 et c-Myc qui permet la prolifération des macrophages. La perte de l'effet répresseur de MAFB et c-MAF sur ETS1/2 et Spi-1/PU.1, deux facteurs de transcription activant respectivement les promoteurs de *c-Myc* et *KLF4*, expliquerait la surexpression de ces derniers. Ainsi, la perte d'expression de MAFB et c-MAF permet l'expansion de macrophages matures et fonctionnels.

e. IRF8

IRF8 aussi appelé ICSBP fait partie de la famille des facteurs de transcription appelés IRF (*interferon regulatory factor*). Il est impliqué à plusieurs niveaux de la myélopoïèse, notamment la différenciation et l'engagement dans le lignage monocyto-macrophagique (Holtschke et al. 1996; Tamura et al. 2000; Hambleton et al. 2011; Becker et al. 2012). Son absence au sein de souris nullizygotés conduit à des désordres myéloprolifératifs caractérisés par l'expansion de granulocytes et à un moindre degré de monocytes (Holtschke et al. 1996) rassemblant les caractéristiques phénotypiques de la LMC humaine, ainsi qu'une susceptibilité plus importante aux infections virales et une production réduite d'IFN γ (Holtschke et al. 1996). IRF8 intervient également à partir des progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes afin de les engager dans la voie de différenciation dendritique (Becker et al. 2012). Il agit aussi sur la maturation des macrophages. En effet, le rétablissement de son expression dans les progéniteurs myéloïdes chez des souris nullizygotés pour *Irf8* induit leur différenciation macrophagique (Tamura et al. 2000).

f. C/EBP β

La famille C/EBP (*CCAAT/enhancer binding protein*) regroupe les six facteurs de transcription C/EBP α , β , δ , ϵ , γ et ζ , dont les quatre premiers sont exprimés dans les cellules myéloïdes. Pour en comprendre le rôle, des modèles murins porteurs d'une invalidation du gène codant pour chacun de ces facteurs ont été générés. Ainsi, les souris n'exprimant pas *c/ebp α* présentent une agranulocytose liée à la perte d'expression du g-csfr ainsi qu'une éosinopénie alors que le taux de monocytes est normal. L'absence de ce facteur de

transcription induit également l'expansion de myéloblastes circulants. En sus, l'invalidation de *c/ebpβ* et *c/ebpε* a des conséquences sur les granulocytes, conférant à ces facteurs de transcription un rôle essentiel dans la granulopoïèse. C/EBPβ agit sur leur survie et C/EBPε sur le développement de leurs caractéristiques fonctionnelles (Yamanaka et al. 1997; Hirai et al. 2006; Akagi et al. 2008). Ces trois facteurs transcriptionnels interviennent aussi au cours de la différenciation macrophagique. L'absence d'expression de C/EBPα provoque en effet la disparition des progéniteurs macrophagiques *in vitro* et une incapacité à générer des macrophages *in vivo* (Heath et al. 2004). En outre, ce facteur de transcription permet la polarisation des macrophages M1 et M2 (Lee et al. 2014). A l'instar de C/EBPα, C/EBPβ est essentiel à la différenciation macrophagique. Ainsi, sa suppression est responsable de l'absence de macrophages alvéolaires alors que les macrophages cutanés, spléniques, rénaux et hépatiques sont préservés (Cain et al. 2013). C/EBPβ contrôle également la voie de signalisation du LPS. Les TLR, récepteurs membranaires présents à la surface des macrophages, permettent la reconnaissance des agents pathogènes par ces derniers. Par exemple, TLR4 reconnaît les LPS portés à la fois par les bactéries à Gram positif et négatif. NFκB (*nuclear factor kappa B*) est un facteur de transcription indispensable à la réponse immune innée. Après la reconnaissance d'un LPS bactérien par un TLR macrophagique, la transcription de nombreux gènes est activée. Cela fait intervenir NFκB mais aussi un autre facteur de transcription appelé TNFAIP3 (*tumor necrosis factor alpha-induced protein 3*), dont l'activité est liée à p38, une MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), dépendant elle-même de C/EBPβ (Lai et al. 2013). Quant à C/EBPε, son invalidation au sein des macrophages entraîne leur dysmorphisme et une déficience fonctionnelle (Tavor et al. 2002).

g. EGR1 et EGR2

EGR1 et EGR2 sont des facteurs de transcription à doigts à zinc. Ils sont aussi requis lors de la différenciation macrophagique. Egr2 l'induit en activant le promoteur de *c-fms*, en coopération avec Spi-1/Pu.1 (Krysinska et al. 2007). Il est nécessaire à la fixation de ce dernier au niveau de l'élément intronique de *c-fms* (FIRE : *c-fms intronic regulatory element*). Ainsi, Spi-1/Pu.1 intervient dès le stade des progéniteurs myéloïdes alors que Egr2 est actif dans les cellules myéloïdes différenciées (Krysinska et al. 2007). EGR1 et EGR2 inhibent l'expression des gènes impliqués dans la granulopoïèse pour privilégier la voie monocyto-

macrophagique. GFI-1 (*growth factor independent-1*), facteur de transcription de la voie de différenciation granulocytaire est ainsi réprimé par EGR1 et EGR2.

3. Le rôle des microARN

Comme mentionné précédemment, notre équipe s'est intéressée au microARN miR-142-3p. Notre étude ne s'est pas limitée à son rôle au cours de la LMMC et nous avons ainsi montré que miR-142-3p est un modulateur important de la différenciation macrophagique. En effet, son expression diminue rapidement au cours de la différenciation macrophagique de monocytes humains induite par le CSF-1. Nous avons par ailleurs décrit une boucle de régulation négative entre miR-142-3p et le facteur de transcription EGR2. Ainsi, l'augmentation précoce de l'expression de *EGR2* est parfaitement corrélée à la baisse du taux de miR-142-3p, faisant de *EGR2* une cible directe de ce microARN. L'action de EGR2 au cours du processus de différenciation est donc favorisée par la diminution de miR-142-3p (Lagrange et al. 2013).

4. Rôle de PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor*)

Ce facteur de transcription appartient à la famille des récepteurs nucléaires. Décrit comme régulateur de la différenciation des adipocytes, son rôle a depuis été mis en évidence au cours du développement des maladies cardiovasculaires en étant présent dans les macrophages impliqués dans l'athérosclérose (Ricote et al. 1998; Tontonoz et al. 1998). PPAR γ contribue aussi à la polarisation des macrophages M2 en modifiant le profil d'expression génique selon un processus dépendant de l'IL-4 et de STAT6 (Szanto et al. 2010). Plusieurs études réalisées chez l'Homme ont démontré son rôle dans les macrophages des tissus associés aux muqueuses, des ganglions, des poumons (Szanto et al. 2010) et les macrophages alvéolaires (Bonfield et al. 2003). Chez la Souris, PPAR γ a aussi une expression élevée au sein des macrophages pulmonaires et à un moindre degré dans les macrophages spléniques et les monocytes Ly6C^{low} sanguins (Gautier et al. 2012a). Les souris porteuses d'une délétion du gène *PPAR γ* développent une protéinose alvéolaire précoce en rapport avec l'altération des macrophages alvéolaires qui ne se rencontre habituellement pas avant l'âge de 4 mois, attestant du rôle de PPAR γ dans ce type de macrophages (Bonfield et al. 2008).

5. Rôle de TIF1 γ au cours de la différenciation macrophagique

Une parfaite corrélation entre le niveau d'expression de *TIF1 γ* et celui de *CSF1R* (*colony stimulating factor 1 receptor*) dans les monocytes de patients atteints de LMMC a été identifiée (Aucagne et al. 2011). En effet, les patients dont le niveau d'expression de *TIF1 γ* est faible présentent un faible taux de CSF1R au niveau des monocytes circulants. Ces résultats ont été confirmés grâce au modèle de souris *Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$* pour lequel l'expression du *Csf1r* est significativement diminuée dans les cellules médullaires totales ainsi que dans les cellules Lin⁻. Ces travaux ont également démontré que les souris *Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$* possèdent environ 3 fois moins de macrophages péritonéaux que les souris contrôles (Aucagne et al. 2011). Ainsi, il semble possible que *TIF1 γ* puisse avoir un rôle au cours de la différenciation monocyto-macrophagique.

IV. La myélopoïèse pathologique : les cellules myéloïdes immunosuppressives : MDSC (*myeloid-derived suppressor cells*)

Les MDSC sont une population myéloïde immature très hétérogène, se développant dans de nombreuses circonstances, notamment et surtout les contextes néoplasiques. Elles sont issues d'une myéloprolifération aberrante secondaire à la présence de facteurs de croissance solubles sécrétés par les cellules tumorales. Les MDSC sont capables d'inhiber la réponse immune anti-tumorale, facilitant l'expansion tumorale.

L'étude de la prolifération myéloïde dans notre modèle murin nous a amené à nous intéresser à cette population. Ainsi, nous aborderons plus en détail les caractéristiques de ces cellules lors de la discussion des résultats de notre étude.

V. Rôles de Tif1 γ en contexte pathologique

A. Rôle de TIF1 γ au cours de maladies inflammatoires

La dermatomyosite (DM) est une maladie auto-immune affectant les fibres collagènes de la peau et des muscles squelettiques, pouvant se développer comme un syndrome paranéoplasique au cours des cancers bronchiques ou digestifs. Une équipe de recherche a identifié des auto-anticorps (Ac) anti-TIF1 α et anti-TIF1 γ chez des patients présentant cette pathologie. La présence d'auto-Ac anti-TIF1 γ a été rapportée chez deux jeunes patientes et

celle des deux types d'auto-Ac a été révélée chez deux autres patients. Les patientes porteuses des Ac anti-TIF1 γ ne présentaient pas de néoplasie associée (Matsuura et al. 2012). En outre, une équipe japonaise a étudié la présence d'Ac anti-TIF1 γ et anti-Mi chez douze patients porteurs d'une DM anti-TIF1 α positifs. Sept patients avaient des Ac anti-TIF1 γ positifs et cinq des Ac anti-Mi positifs. Parmi les sept patients doublement positifs pour les Ac anti-TIF1 α /TIF1 γ , trois présentaient une DM juvénile et deux une DM associée au cancer (Muro et al. 2012).

B. *TIF1 γ* : un oncogène

A partir de l'étude de différents cancers, le rôle oncogénique de *TIF1 γ* a été mis en évidence comme par exemple au cours du **cancer colorectal (CCR)** chez l'Homme. L'équipe de Ru-Liang Xu a révélé une hyper-expression précoce de *TIF1 γ* dans la carcinogenèse colorectale. En effet, leur étude indique que son expression est augmentée dans 19% des polypes hyperplasiques, 60% des adénomes tubulaires et 47% des CCR. De plus, l'hyper-expression de *TIF1 γ* est plus importante dans les CCR de stade III comparés aux stades I et II. Enfin, il existe une corrélation entre l'hyper-expression de *TIF1 γ* et la perte d'expression de Smad4 (Jain et al. 2011). En outre, le rôle de *tif1 γ* a été souligné au cours de la **leucémie aiguë lymphoblastique B** murine. Il inhibe l'apoptose des cellules blastiques en réprimant l'activité pro-apoptotique de Bim, *via* un antagonisme de *Spi-1/Pu.1* (Wang et al. 2015).

C. *TIF1 γ* : un gène suppresseur de tumeur

1. Son rôle au cours de néoplasies solides (Figures 15a et 15b)

Comme décrit précédemment, son rôle suppresseur de tumeur a été mis en évidence à plusieurs reprises. Ainsi, sa perte d'expression participe au développement des **carcinomes hépatocellulaires (CHC)** murins en association avec Tif1 α (Herquel et al. 2011). Chez l'Homme, la diminution d'expression de ce gène facilite le **développement métastatique des CHC** (Ding et al. 2014) et favorise celui des **lésions précancéreuses pancréatiques** dépendantes de Kras^{G12D} (Vincent et al. 2009). Une étude réalisée *in vitro* sur des néoplasies pancréatiques a mis en évidence que le déséquilibre d'expression de *TIF1 γ* inhibe la progression des cellules tumorales pancréatiques, faisant de ce gène une cible potentielle pour

la prise en charge thérapeutique de ce type de cancer (Ligr et al. 2014). Sa perte d'expression au sein de **cellules épithéliales mammaires humaines** a par ailleurs pour conséquence le développement de la transition épithélio-mésenchymateuse, responsable du caractère métastatique des tumeurs solides, faisant intervenir la voie de signalisation du TGF β 1 (Hesling et al. 2011). Au cours des **néoplasies de la tête et du cou**, sixième incidence au rang mondial des cancers, la diminution d'expression de plusieurs gènes a été mise en évidence dont celle de *TIF1 γ* (Li et al. 2014b). Les **carcinomes bronchiques non à petites cellules** sont caractérisés par la présence au niveau des cellules carcinomateuses de la fusion du gène *RET* avec d'autres gènes, notamment *TIF1 γ* . L'équipe de Naiyer Rivzi a démontré que l'inhibiteur de RET, le Cabozantinib, est efficace chez deux patients porteurs de ce type de néoplasie avec une fusion *RET/TIF1 γ* (Drilon et al. 2013). *TIF1 γ* a également été décrit comme cible de microARN, notamment au cours des cancers rénaux. Le **carcinome rénal à cellules claires**, représentant le type histologique le plus fréquent des carcinomes rénaux, met en jeu plusieurs microARN. Un travail de recherche publié en 2014 a rapporté l'hyperexpression de miR-629 dans les cellules carcinomateuses rénales de patients malades. La cible génique de ce microARN a été identifiée comme étant *TIF1 γ* . L'utilisation d'un inhibiteur de ce microARN a pour conséquence la régulation positive de l'expression de *TIF1 γ* et donc la suppression de l'activité des Smad de la voie du TGF β . De plus, l'emploi d'un agoniste de miR-629 facilite les effets de la voie du TGF β sur les facteurs participant à l'EMT, garantissant la mobilité et l'envahissement des autres tissus par les cellules carcinomateuses rénales. Ces données ont ainsi identifié miR-629 comme un régulateur de la voie TGF β /Smad *via* le contrôle de l'expression de *TIF1 γ* dans les carcinomes rénaux à cellules claires (Jingushi et al. 2014).

Les travaux de l'équipe de Laurent Bartholin ont montré que *Tif1 γ* exerce son rôle suppresseur de tumeur en contrôlant la stabilité chromosomique (Pommier et al. 2015). En effet, l'inactivation de *Tif1 γ* dans les fibroblastes embryonnaires murins et dans les cellules NMuMG (*normal murine mammary gland*) entraîne respectivement l'accumulation d'anomalies nucléaires et des défauts sévères de la ploïdie. Chez l'Homme, la diminution d'expression de *TIF1 γ* accroît les instabilités chromosomiques tumorales.

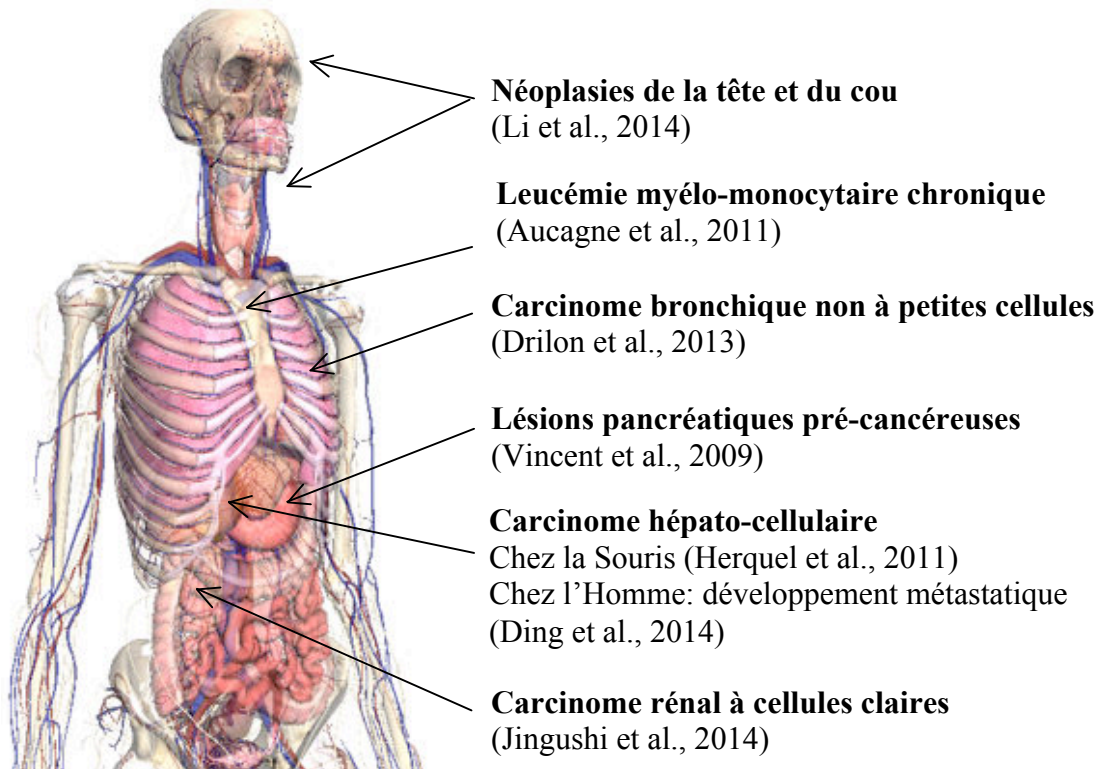


Figure 15a : Représentation schématique du rôle suppresseur tumeur de *TIF1 γ* chez l'Homme

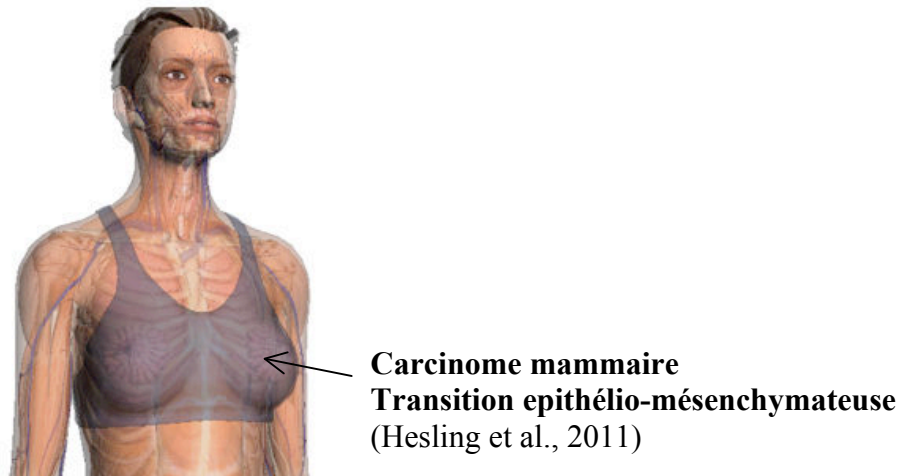


Figure 15b : *TIF1 γ* intervient aussi au cours des néoplasies mammaires

2. Son rôle au cours de l'hématopoïèse pathologique : développement d'une leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC)

Le phénotype du poisson-zèbre mutant *moonshine*, présentant des défauts sévères de l'hématopoïèse, a incité notre équipe à émettre l'hypothèse d'un rôle essentiel de *Tif1 γ* dans l'hématopoïèse des Mammifères. Du fait de la létalité embryonnaire entraînée par la délétion

totale de *Tifl γ* chez la Souris, l'étude de son rôle dans l'hématopoïèse adulte n'est possible qu'en utilisant une stratégie de délétion conditionnelle du gène dans les cellules hématopoïétiques. A cette fin, le système « Cre-LoxP » (*cyclization recombinase-locus of cross over in P1*) a été utilisé. Une souris dont les exons 2, 3 et 4 du gène *Tifl γ* sont flanqués de séquences « loxP » a été croisée avec une souris exprimant la recombinaison « Cre » placée sous le contrôle du promoteur du gène *cFES* humain, exprimé dans les progéniteurs hématopoïétiques (Keller et al. 2001). Ce croisement nous a permis d'obtenir une souris *c-FES-Cre-Tifl γ* présentant une délétion conditionnelle du gène *Tifl γ* dans l'ensemble des cellules hématopoïétiques dont les cellules souches et progénitrices. Cette souris est appelée *Tifl $\gamma^{\Delta/\Delta}$* (ou Δ/Δ) lorsque le gène est invalidé sur les deux allèles (Aucagne et al. 2011). Les souris n'exprimant pas *Tifl γ* dans les cellules hématopoïétiques survivent et ne développent pas d'anémie, ce qui est probablement dû à une compensation splénique. Ce résultat contraste avec ceux du Poisson-Zèbre. L'inactivation de *Tifl γ* dans les cellules hématopoïétiques entraîne une expansion sélective des GMP et des CSH (Aucagne et al. 2011; Kusy et al. 2011). Entre 6 et 10 mois, les souris *Tifl $\gamma^{\Delta/\Delta}$* développent un syndrome myéloprolifératif/myélodysplasique caractérisé par une hyperleucocytose due à une myéloprolifération, une hyperplasie médullaire myéloïde, une hépatosplénomégalie ainsi que des stigmates de dysplasie sanguine. L'ensemble de ces anomalies mime le syndrome myéloprolifératif/myélodysplasique humain de type LMMC (Aucagne et al. 2011). Chez la Souris, cette hémopathie est par ailleurs transplantable, faisant du phénotype *Tifl $\gamma^{\Delta/\Delta}$* un phénotype indépendant du microenvironnement. L'équipe de Léonard Zon a également généré un modèle murin porteur de la délétion de *Tifl γ* au niveau hématopoïétique. Les souris présentent un blocage de la maturation érythroïde dans la moelle osseuse avec des défauts de l'élongation transcriptionnelle des gènes érythroïdes, confirmant les données précédentes de l'équipe sur le rôle de ce gène au cours de l'érythropoïèse, mais aussi une prolifération granulocytaire et une lymphopénie B, attestant du rôle de ce gène à de nombreux niveaux de l'hématopoïèse (Bai et al. 2013).

D. Rôle de TIF1 γ au cours de la LMMC humaine

En collaboration avec l'équipe d'Eric Solary (UMR 1170 Inserm, IGR, Villejuif), nous avons étudié l'expression du gène *TIF1 γ* chez des patients porteurs d'une LMMC. Cette étude a démontré qu'environ 35% des patients présentent une très faible expression de *TIF1 γ* , qui est le plus souvent indétectable. Cette diminution d'expression est due à une hyperméthylation

des îlots CpG et à des modifications d'histones au niveau du promoteur du gène. La décitabine, agent hypométhylant utilisé dans le traitement de la LMMC humaine, restaure la méthylation du promoteur de *TIF1 γ* et ceci est associé à une normalisation de l'expression du gène (Aucagne et al. 2011). Néanmoins, la délétion de *TIF1 γ* chez l'Homme porteur d'une LMMC n'est pas corrélée à l'efficacité de la Décitabine (données non publiées). Ainsi, le modèle de souris *Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$* constitue un excellent modèle d'étude de la physiopathologie de la LMMC humaine.

1. La leucémie myélomonocytaire chronique

a. Définition

La LMMC est une maladie clonale maligne de la cellule souche hématopoïétique caractérisée par la présence d'une monocytose sanguine. Longtemps considérée comme un syndrome myélodysplasique selon la classification FAB (*French-American-British*) (Bennett et al. 1982), la LMMC revêt en réalité des caractéristiques à la fois myélodysplasiques et myéloprolifératives. Ainsi, en 2008, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a intégré la LMMC au sein d'une nouvelle catégorie de néoplasies myéloprolifératives/myélodysplasiques (Vardiman 2010) (Swerdlow et al. 2008) dont font également partie la LMC (leucémie myéloïde chronique) atypique BCR/ABL (*breakpoint cluster region/abelson*) négative, la LMMj (leucémie myélomonocytaire juvénile) et les néoplasies myélodysplasiques/myéloprolifératives inclassables.

Selon la définition OMS 2008, cette hémopathie maligne est définie par les cinq critères suivants (Swerdlow et al. 2008) :

- un excès stable de monocytes circulants supérieur ou égal à 1000/mm³ sans autre étiologie retrouvée et représentant plus de 10% des leucocytes totaux,
- l'absence du chromosome Philadelphie et du gène de fusion *BCR/ABL*,
- l'absence de réarrangements *PDGFR α* et *PDGFR β* (*platelet-derived growth factor receptor*),
- une blastose médullaire de moins de 20%,
- la présence d'au moins un des critères suivants
 - o une dysplasie sur au moins une lignée

- la présence d'une anomalie cytogénétique ou moléculaire clonale dans les cellules hématopoïétiques
- une monocytose persistant plus de 3 mois en l'absence d'autre étiologie.

Selon le pourcentage de blastes médullaires et sanguins, l'OMS distingue deux types de LMMC :

- la LMMC de type 1 si les blastes sanguins sont inférieurs à 5% et les blastes médullaires inférieurs à 10%,
- la LMMC de type 2 si les blastes sanguins sont entre 5 et 19% et les blastes médullaires entre 10 et 19%.

b. Epidémiologie

Rare hémopathie du sujet âgé, l'âge médian au diagnostic se situe entre 65 et 75 ans (Parikh and Tefferi 2012). Son incidence est estimée à 0,5 pour 100 000 habitants au niveau mondial (Orazi and Germing 2008). Celle-ci augmente avec l'âge pour atteindre 3 sur 100 000 cas annuels chez les sujets de plus de 60 ans (Orazi and Germing 2008; Parikh and Tefferi 2012). Il existe une prédominance masculine avec une répartition de 2 pour 1.

La LMMC est la néoplasie myéloproliférative/myélodysplasique la plus fréquente et représente environ 2% des hémopathies malignes de l'adulte (Phekoo et al. 2006).

c. Présentation clinique

La LMMC est une maladie très hétérogène quant à sa présentation clinique.

Elle peut entraîner l'apparition d'une hépatosplénomégalie, sans adénopathies associées le plus souvent. Le reste de l'examen somatique peut mettre en évidence des signes d'insuffisance médullaire (syndromes anémique, infectieux et hémorragique). Des manifestations rhumatologiques et dermatologiques sont par ailleurs possibles, représentées par des arthralgies inflammatoires, des épanchements des séreuses, des vascularites cutanées ou encore des dermatoses neutrophiliques telles que le *pyoderma gangrenosum*.

d. Physiopathologie

Si la définition de la LMMC est effectivement basée sur la monocytose sanguine, il est communément admis que cette population est très hétérogène. Depuis 2009, l'équipe d'Eric Solary s'interroge sur cette hétérogénéité de la population monocytaire des patients porteurs d'une LMMC. Son équipe a mis en évidence au sein de la population mononucléée du sang périphérique de ces patients une population granulocytaire dysplasique immature $CD14^-/CD24^+$ (Droin et al. 2010). L'étude protéomique des populations $CD14^+/CD24^-$ (monocytaire) et $CD14^-/CD24^+$ (granulocytaire) retrouvait une différence d'expression concernant l'alpha-défensine HNP1-3, plus exprimée au sein de la population granulocytaire $CD24^+$. Cette protéine est responsable de l'inhibition de la différenciation de la population $CD14^+/CD24^-$ en macrophages *via* l'inhibition du CSF-1. Cette même équipe s'est par la suite intéressée à l'étude de la prolifération des trois populations monocytaires au cours de la LMMC. Elle a montré que la population classique $CD14^+CD16^-$ est majoritaire chez ces patients et tend à décroître après un traitement avec des agents hypométhylants. Dans leur étude, cette population $CD14^+CD16^-$ constitue un marqueur diagnostique sensible et spécifique en faveur de la LMMC lorsqu'elle représente plus de 94% des monocytes totaux (Selimoglu-Buet et al. 2015). Cela est intéressant dans la mesure où il n'est pas toujours aisé de distinguer la monocytose réactionnelle, la LMMC et certaines formes de myélofibrose.

Le caractère à la fois dysplasique et myéloprolifératif de la LMMC a également été étudié par l'équipe d'Eric Solary. L'existence d'une dominance clonale précoce représentée par les mutations de *TET2* (*ten eleven translocation 2*) et/ou *SRSF2* (*serine/arginine-rich splicing factor 2*), survenant à un stade précoce de l'hématopoïèse ($CD34^+/CD38^-$) biaise la différenciation du progéniteur myéloïde commun vers les cellules granulocytaires et monocytaires, entraînant une prolifération granulomonocytaire aux dépens des érythrocytes et des mégacaryocytes (Itzykson et al. 2013b; Itzykson and Solary 2013). Cette hyperplasie myéloïde est majorée par des mutations additionnelles au niveau des gènes touchant les voies de signalisation telles que *CBL* (*casitas B lymphoma*) ou *RAS* (*rat sarcoma*), induisant une hypersensibilité au GM-CSF (*granulocyte macrophage-colony stimulating factor*). Ainsi, ces mutations pourraient expliquer le caractère myéloprolifératif de la LMMC.

Les mutations de *SF3B1* (*splicing factor 3B1*) et de *RUNX1* (*runt-related transcription factor 1*) rendent compte du caractère dysplasique de la LMMC, responsables respectivement des dysplasies érythroïde et mégacaryocytaire.

e. Anomalies cytogénétiques et moléculaires

Trente pour cent des patients présentent une ou plusieurs anomalies cytogénétiques lors du diagnostic de LMMC (Such et al. 2011; Such et al. 2013; Tang et al. 2014).

D'après Esperanza Such et ses collaborateurs, il existe trois catégories de risque selon les anomalies cytogénétiques.

- un caryotype normal ou une perte isolée du chromosome Y constituant les caryotypes de pronostic favorable, appelé caryotype de faible risque,
- la trisomie 8 ou anomalies du chromosome 7 ou caryotype complexe (≥ 3 anomalies) constituant les caryotypes de pronostic défavorable, appelé caryotype de haut risque,
- les caryotypes de risque intermédiaire représentés par les autres anomalies.

La survie globale à 5 ans des patients présentant un caryotype de faible, intermédiaire ou haut risque est de respectivement 35%, 26% et 4% ($p < 0,001$) dans cette série de 414 patients (Such et al. 2011).

Les techniques de séquençage global telles que le NGS (*next generation sequencing*) ont permis la description d'anomalies moléculaires chez environ 90% des patients atteints de LMMC (Gelsi-Boyer et al. 2012; Itzykson et al. 2013a; Itzykson et al. 2013b). Ces mutations peuvent concerner :

- des gènes de régulation épigénétique comme
 - o *TET2* (Abdel-Wahab et al. 2009; Gelsi-Boyer et al. 2009; Jankowska et al. 2009; Kosmider et al. 2009; Kohlmann et al. 2010; Smith et al. 2010; Grossmann et al. 2011; Itzykson et al. 2013a; Itzykson et al. 2013b; Patnaik et al. 2013b) et *DNMT3a* (*DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3a*), intervenant dans la méthylation de l'ADN (Gelsi-Boyer et al. 2009; Abdel-Wahab et al. 2011b; Jankowska et al. 2011; Itzykson et al. 2013a; Itzykson et al. 2013b; Patnaik et al. 2013b), *IDH1* et *IDH2* (isocitrate déshydrogénase) (Kosmider et al. 2010),
 - o *EZH2* (Histone-lysine N-méthyltransférase), *ASXL1* (*additional sex combs like 1*), intervenant dans les modifications covalentes d'histone (Gelsi-Boyer et al. 2009; Abdel-Wahab et al. 2011a; Grossmann et al. 2011; Itzykson et al. 2013a; Itzykson et al. 2013b; Patnaik et al. 2013b),

- des gènes agissant sur l'épissage alternatif en tant que gènes du complexe de l'épissosome tels que *SF3B1*, *ZRSF2*, *U2AF1* et *SF3F2* (Yoshida et al. 2011; Makishima et al. 2012; Meggendorfer et al. 2012; Kar et al. 2013; Patnaik et al. 2013a),
- des facteurs de transcription dont *RUNX1*, régulateur de l'hématopoïèse primitive et de la mégacaryopoïèse et *TP53*, gène suppresseur de tumeur (Gelsi-Boyer et al. 2008; Kuo et al. 2009; Kohlmann et al. 2010),
- les oncogènes *JAK2* (Janus kinase 2), *N/KRas*, *FLT3* (*fms like tyrosine kinase 3*), *CBL*, dont les mutations stimulent la signalisation des récepteurs cytokiniques (Gelsi-Boyer et al. 2008; Kuo et al. 2009; Kohlmann et al. 2010).

Les conséquences de ces différentes mutations sur la CSH lui confèrent un avantage sélectif, tout en induisant un défaut de différenciation.

f. Rôle des miARN au cours de la LMMC

Notre équipe s'est intéressée au rôle de miR-142-3p au cours de cette hémopathie maligne. Nous avons montré en collaboration avec l'équipe d'Eric Solary une sous-expression de ce miARN au sein des monocytes de patients porteurs d'une LMMC ainsi qu'une sur-expression de *EGR2* (*early growth response 2*) dans les monocytes tumoraux *versus* monocytes contrôles. Parallèlement, nous avons mis en évidence une boucle de régulation entre miR-142-3p et *EGR2* (cf paragraphe « rôle des microARN dans la différenciation macrophagique). Nos résultats chez les patients LMMC indiquent ainsi une dérégulation de la boucle de rétrocontrôle entre *EGR2* et miR-142-3p au cours de cette hémopathie (Lagrange et al. 2013).

L'équipe d'Eric Solary a quant à elle étudié le rôle de miR-150 au cours de la LMMC. Ainsi, elle a mis en évidence une diminution importante de ce microARN au sein des cellules leucémiques des patients atteints de LMMC, l'expression de miR-150 étant inversement corrélée à la monocytose. Il n'existe pas de corrélation entre le pronostic et le niveau d'expression de ce microARN. La monocytose est expliquée par un défaut de différenciation des monocytes malins en macrophages sous l'effet du CSF-1 (*colony stimulating factor 1*). Cela a été vérifié par une technique de nucléofection qui a permis d'inhiber miR-150 dans les monocytes malins. Cela induit la différenciation monocyto-macrophagique sous l'effet du CSF-1 (données non publiées, abstract SFH 2012).

g. Facteurs pronostiques

L'hétérogénéité de la LMMC ne se traduit pas seulement dans ses présentations clinique et biologique mais également dans son pronostic. Néanmoins, celui-ci reste globalement péjoratif avec une médiane de survie variant de 20 à 40 mois (Germing et al. 2004). Cette différence tient surtout aux caractéristiques cytogénétiques et moléculaires lors du diagnostic. Son évolution ultime est l'acutisation en LAM (leucémie aiguë myéloblastique) (Germing et al. 2004; Bacher et al. 2011).

Il existe plusieurs classifications pronostiques avec pour objectif la détermination de la survie médiane du patient d'une part et le délai médian de transformation aiguë blastique d'autre part. Le score IPSS (*international prognostic scoring system*) développé par Peter Greenberg et ses collègues en 1997 (Greenberg et al. 1997) est utilisé pour l'ensemble des syndromes myélodysplasiques et n'est pas spécifique de la LMMC. Il fait intervenir trois variables :

- le nombre de cytopénies périphériques (taux d'hémoglobine inférieur à 10 g/dL, PNN inférieurs à 1500/mm³ et numération plaquettaire inférieure à 100 000/mm³),
- le pourcentage de blastes médullaires
- et le caryotype médullaire de faible/intermédiaire/haut risque que l'on définit de la façon suivante :
 - o un caryotype de faible risque : normal, délétion Y, délétion 5q, délétion 20q
 - o un caryotype de haut risque : anomalies du chromosome 7, caryotypes complexes (≥ 3 anomalies)
 - o un caryotype de risque intermédiaire regroupant les autres anomalies.

Ce score permet de classer les patients en quatre catégories :

- score IPSS à 0 : risque faible
- score IPSS à 0,5 ou 1 : risque intermédiaire-1
- score IPPS à 1,5 ou 2 : risque intermédiaire-2
- score $\geq 2,5$: risque élevé

L'utilisation de l'Azacitidine est basée sur ce score et l'AMM (autorisation de mise sur le marché) a été obtenue pour les SMD de risque intermédiaire-2 ou élevé (Fenaux et al. 2009).

Par ailleurs, selon le score IPPS, le délai médian vers l'acutisation est différent et concerne 31% des patients de faible risque à 9,4 ans, 39% des patients de risque intermédiaire-1 à 3,3 ans, 22% des patients de risque intermédiaire-2 à 1,1 an et 8% des patients de risque élevé à 0,2 an.

Enfin, la médiane de survie varie d'un groupe à l'autre : 5,7 ans pour les patients de faible risque, 3,5 ans pour les patients de risque intermédiaire-1, 1,2 an pour les patients de risque intermédiaire-2 et 0,4 an pour les patients de risque élevé.

Le score IPPS-R développé par Peter Greenberg et ses associés en 2012 (Greenberg et al. 2012) prenant en compte cinq variables (caryotype médullaire, blastose médullaire, taux d'hémoglobine, de PNN et la numération plaquettaire) n'est pas non plus spécifique de la LMMC. Ainsi, il a été proposé plusieurs scores pronostiques spécifiques de la LMMC.

Le score pronostique du MD Anderson (MDAPS) est basé sur les taux d'hémoglobine, de cellules myéloïdes immatures circulantes, de lymphocytes et le pourcentage de blastes médullaires (Onida et al. 2002). Celui récemment publié par l'équipe d'Esperanza Such (Such et al. 2013) est le score CPSS (*CMML-specific prognostic scoring system*), établi au sein d'une série de 558 patients. Les paramètres pronostiques les plus pertinents pour la survie globale (SG) d'une part et le délai médian d'acutisation d'autre part sont les types de LMMC selon les classifications FAB et de l'OMS, le caryotype médullaire et la dépendance transfusionnelle en culots de globules rouges. Ce score classe ainsi les patients en quatre groupes statistiquement différents en termes de SG ($p < 0,001$) et d'acutisation ($p < 0,001$). Le score CPSS alternatif prend en compte le taux d'hémoglobine, remplaçant ainsi la dépendance transfusionnelle.

Enfin, l'équipe d'Eric Solary a proposé en 2013 un score pronostique incluant les mutations géniques retrouvées au cours de la LMMC (Itzykson et al. 2013a). Au sein d'une cohorte de 312 patients, en analyse univariée, les facteurs pronostiques pertinents préjugeant une SG inférieure correspondent aux mutations des gènes *ASXL1* ($p < 0,0001$), *SRSF2* ($p = 0,03$), *CBL* ($p = 0,003$) et *IDH2* ($p = 0,03$). Les facteurs pronostiques indépendants retenus sont les mutations de *ASXL1*, l'âge supérieur ou égal à 65 ans, un taux de leucocytes supérieur à $15000/\text{mm}^3$, une thrombopénie inférieure à $100000/\text{mm}^3$, ainsi qu'une anémie (hémoglobine inférieure à 10 g/dL chez la femme et 11 g/dL chez l'homme). Ce score permet de discriminer trois groupes de patients dont la SG médiane n'est pas atteinte, ou atteinte après 38,5 mois ou 14,4 mois. Ce résultat a été validé au sein d'une cohorte indépendante de 165 patients.

h. Prise en charge thérapeutique

En l'absence de signes de myéloprolifération (splénomégalie, hyperleucocytose, myélémie), l'indication de prise en charge thérapeutique de la LMMC ne diffère pas de celle des SMD ayant les mêmes caractéristiques (à la monocytose près), en terme de blastes médullaires et de

caryotype. Les agents hypométhylants (5-Azacitidine ou 5-AZA) ou la Décitabine, inhibiteurs de DNA méthyltransférase, ont prouvé leur efficacité dans les formes avancées de LMMC (LMMC 2) afin de retarder leur acutisation en LAM (Aribi et al. 2007; Wijermans et al. 2008; Fenaux et al. 2009; Braun et al. 2011; Costa et al. 2011). La 5-AZA a donc une AMM dans cette indication. Le mécanisme d'action des agents déméthylants reste toujours hypothétique mais il est établi que ces agents pharmacologiques s'incorporent à l'ADN durant la phase S du cycle cellulaire, se lient de façon covalente aux ADN-méthyltransférases qui deviennent alors des cibles pour le protéasome. Toutefois, seuls 50% des patients atteints de SMD ou SMD/SMP ont un bénéfice clinique à l'utilisation de la 5-AZA (Griffiths and Gore 2008). Plusieurs équipes de recherche ont montré que la présence de mutations de *TET2* (Itzykson et al. 2011; Bejar et al. 2014; Traina et al. 2014) et *DNMT3A* (Traina et al. 2014), au cours de SMD, SMD/SMP voire même de LAM pauciblastiques, est associée à une meilleure réponse aux agents hypométhylants mais sans amélioration sur la survie globale. Ainsi, l'équipe de Maria E. Figueroa s'est interrogée sur l'existence d'autres facteurs pronostiques de la survie et de la réponse thérapeutique au cours de la LMMC (Meldi et al. 2015). Chez 40 patients atteints de LMMC nouvellement diagnostiquée traités par Décitabine, cette équipe n'a retrouvé aucune mutation somatique ayant un impact sur la réponse thérapeutique. Elle a par contre identifié 167 régions de l'ADN dont le profil de méthylation est différent, permettant de distinguer les patients répondeurs des patients non répondeurs à la Décitabine. Les gènes activés chez les patients répondeurs sont ceux du cycle cellulaire, ce qui suggère une meilleure « incorporation » de la molécule au niveau de l'ADN, donc une meilleure réponse au traitement.

En présence de signes de myéloprolifération, l'hydroxyurée reste le traitement de référence même si son efficacité est limitée (Wattel et al. 1996).

Le seul traitement curatif reste à ce jour la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques mais la LMMC étant avant tout une pathologie du sujet âgé, le recours à cette thérapeutique est rare.

VI. Objectifs

A. Etudier le rôle de *Tif1γ* au cours de la myélopoïèse des souris *Tif1γ^{Δ/Δ}*

La mise en évidence d'une myéloprolifération médullaire et sanguine des souris *Tif1γ^{Δ/Δ}* nous a rapidement incité à caractériser cette population myéloïde. Notre attention s'est rapidement

ournée vers les cellules granulomonocytaires puisque les lignages érythroïde et mégacaryocytaire ne semblaient pas directement perturbés par la baisse d'expression de *Tif1γ*. L'aspect morphologique des cellules myéloïdes au frottis sanguin, très atypique et à la fois très immature ainsi que les difficultés rapidement rencontrées pour discriminer les populations granulocytaires et monocytaires au sein de cette prolifération myéloïde nous ont peu à peu mis sur la piste des cellules myéloïdes immunosuppressives. Cette idée a été renforcée par la description de ces cellules au cours de nombreuses hémopathies malignes dont les syndromes myélodysplasiques.

Ainsi, l'objectif a été de prouver qu'à ces caractéristiques morphologiques évoquant celles des MDSC s'ajoutaient des caractéristiques phénotypiques, moléculaires et fonctionnelles. A cette fin, nous avons étudié par PCR quantitative l'expression des gènes exprimés par les MDSC, en cytométrie de flux l'expression des marqueurs phénotypiques connus pour être exprimés par les MDSC d'après les données de la littérature, à la fois dans le sang, la moelle osseuse et la rate. Enfin, plusieurs expériences ont été réalisées afin d'explorer les capacités fonctionnelles de ces cellules, mêlant culture cellulaire et ELISA.

B. Etudier le rôle de *Tif1γ* au cours de la différenciation des monocytes

La diminution de la population macrophagique péritonéale des souris *Tif1γ^{Δ/Δ}* ainsi que l'altération de l'expression du *Csf-1r* à la fois à l'échelle moléculaire et protéique mises en évidence il y a quelques années par l'équipe nous a fait émettre l'hypothèse que *Tif1γ* soit un régulateur de la différenciation monocyto-macrophagique. Notre autre objectif était donc d'étudier les populations macrophagiques des souris *Tif1γ^{Δ/Δ}* et la différenciation de cellules myéloïdes médullaires en macrophages sous l'effet du CSF-1 *in vitro*.

L'ensemble des anomalies observées tout au long de la myélopoïèse ont peu à peu fait de *Tif1γ* un gène indispensable à une myélopoïèse équilibrée.

RESULTATS

Résumé de l'article

Les souris porteuses d'une invalidation de *Tiflγ* dans les cellules hématopoïétiques (souris *Tiflγ^{ΔΔ}*) développent un syndrome myélodysplasique/myéloprolifératif mimant la leucémie myélomonocytaire chronique humaine. Outre une prolifération myéloïde sanguine, splénique et médullaire, nous avons parallèlement constaté que la population macrophagique des souris malades était diminuée au niveau péritonéal malgré une monocytose sanguine, possiblement du fait d'une diminution de l'expression de *c-fms*, récepteur au CSF-1 ou M-CSF. Ces deux observations furent à l'origine de ce projet de recherche.

Nous nous sommes donc intéressés à la caractérisation morphologique, phénotypique, moléculaire et fonctionnelle de ces cellules myéloïdes d'une part ainsi qu'à la différenciation myéloïde dans les souris *Tiflγ^{ΔΔ}* d'autre part.

Les frottis sanguins des souris *Tiflγ^{ΔΔ}* ont révélé une population myéloïde morphologiquement très immature avec un noyau en forme d'anneau évoquant des métamyélocytes. Nous avons complété ces données par une analyse immunophénotypique grâce aux marqueurs phénotypiques myéloïdes CD11b et Ly6C afin de discriminer les populations granulocytaire et monocytaire par une stratégie de tri. Chez la souris contrôle, cette distinction était aisée, contrairement à la souris *Tiflγ^{ΔΔ}* porteuse d'une population « intermédiaire » entre les granulocytes et les monocytes. Cette observation nous a permis d'émettre l'hypothèse d'une altération de la différenciation granulo-monocytaire chez la souris *Tiflγ^{ΔΔ}*. Nous l'avons confirmée en étudiant les marqueurs phénotypiques myéloïdes CD11b, Ly6C et Ly6G dans le sang et la moelle osseuse des souris contrôles et *Tiflγ^{ΔΔ}*. Nos résultats suggèrent que les cellules médullaires *Tiflγ^{ΔΔ}* CD11b⁺Ly6G^{high}Ly6C^{low}, en nombre équivalent par rapport aux souris contrôles, ne se différencient pas en granulocytes matures puisque cette population s'accumule dans la circulation sanguine. La morphologie et le phénotype de cette prolifération myéloïde nous a fait émettre l'hypothèse de cellules myéloïdes immunosuppressives de type granulocytaire (MDSC : *myeloid-derived suppressor cells*). Ces cellules dont l'origine fait encore débat n'existent que dans des conditions pathologiques, notamment et surtout en contexte néoplasique. Elles sont caractérisées par une fonction immunosuppressive variable.

Nous avons ainsi étudié les gènes d'expression des MDSC tels que *Stat3*, *S100A8*, *S100A9*, *IL-4Rα*, *iNOS* et *Arginase-1* dans le sang total ainsi que dans les cellules sanguines et

spléniques triées sur les marqueurs phénotypiques Ly6G et Ly6C. L'expression de l'ensemble de ces gènes exceptée celle de *iNOS* et *Arginase 1* est significativement augmentée dans les souris *Tif1 γ ^{$\Delta\Delta$}* .

Nous n'avons pas mis en évidence à ce jour de fonction immunosuppressive dans cette population spécifique. Les expériences d'ELISA nous ont par contre permis de détecter une production accrue de TGF β par les cellules myéloïdes spléniques *Tif1 γ ^{$\Delta\Delta$}* ainsi qu'une augmentation significative de la protéine pro-inflammatoire MCP-1 dans le sérum des souris *Tif1 γ ^{$\Delta\Delta$}* . Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère que l'inactivation de *Tif1 γ* est responsable de l'expansion d'une nouvelle population composée de cellules immatures dont le phénotype évoque celui des PMN-MDSC.

Les autres cellules des lignages myéloïdes ne sont pas altérées dans les souris *Tif1 γ ^{$\Delta\Delta$}* suggérant une hématopoïèse extramédullaire. Celle-ci semble être de siège splénique puisque nous avons montré la présence d'érythroblastes et de mégacaryocytes dystrophiques dans la rate des souris *Tif1 γ ^{$\Delta\Delta$}* . La lignée lymphoïde est au contraire altérée puisque les souris *Tif1 γ ^{$\Delta\Delta$}* sont lymphopéniques. Des examens immunohistochimiques nous ont permis de montrer une diminution des populations lymphocytaires B et T spléniques des souris *Tif1 γ ^{$\Delta\Delta$}* .

Enfin, nous avons étudié la capacité de différenciation de cellules myéloïdes médullaires en macrophages sous l'effet du CSF-1 *in vitro*. Celle-ci est très perturbée tant d'un point de vue numérique que phénotypique et fonctionnel. En effet, les cellules adhérentes issues de cette différenciation expriment peu le F4/80 et le CD115 (CSF-1R). L'expression des gènes impliqués dans ce processus de différenciation est profondément altérée. C'est le cas de *Egr2*, *MafB*, *Klf4* et dans une moindre mesure de *Sp1/Pu.1*. Les fonctions macrophagiques telles que les sécrétions de cytokines et de NO (mesurées respectivement par ELISA et réactif de Griess), la migration (étudiée à l'aide de puits de type *transwell*) et la phagocytose (identifiée *via* des particules fluorescentes d'*E.Coli* en cytométrie en flux) sont très altérées. Enfin, il existe *in vivo* une production diminuée de macrophages, mise en évidence immunohistochimie au niveau médullaire et splénique, au contraire augmentée au niveau hépatique et cutané.

L'ensemble de ces résultats suggère que *Tif1 γ* est cruciale pour le développement équilibré de la myélopoïèse incluant les différenciations granulomonocytaire et macrophagique.

Transcription intermediary factor 1 γ is a negative regulator of the development of an immature granulocytic population

Marie-Lorraine Chrétien^{a,b,°}, Caroline Legouge^{a,b,°}, Romain Z. Martin^a, Arlette Hammann^c, Malika Trad^d, Romain Aucagne^{a,§}, Anne Largeot^{a,£}, Jean-Noël Bastie^{a,b}, Laurent Delva^{a,§,*}, and Ronan Quéré^{a,§}

^a Inserm UMR 866, Labex LipSTIC team, UFR des Sciences de Santé, Université Bourgogne-Franche-Comté, Dijon, France;

^b Department of Clinical Hematology, Hôpital Universitaire de Dijon, Dijon, France;

^c Cytometry platform, Université Bourgogne-Franche-Comté, Dijon, France;

^d Inserm UMR 1098, UFR des Sciences de Santé, Labex LipSTIC team, Université Bourgogne-Franche-Comté, 21000 Dijon, France

[°]Present address: Institut de Recherche en Immunologie et oncologie, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada; [£]Present address: Cancer Research UK Stem Cell Biology Group, Paterson Institute for Cancer Research, The University of Manchester, Manchester, England, United Kingdom

[~]MLC and CL contributed equally to this work.

[§]RQ and LD are equivalent co-senior authors.

Highlights

- A specific immature granulocytic population is developed in Tifl γ -deficient mice
- Tifl γ is critical in controlling granulo-monocytopoiesis
- Macrophage production and activity are altered in Tifl γ -deficient mice

Abbreviations: cfms, cellular-feline McDonough sarcoma or CSF-1 receptor; CSF-1, colony stimulating factor 1; MDSCs, myeloid derived suppressor cells; M-MDSCs, monocytic-MDSCs; PMN-MDSCs, polymorphonuclear-MDSCs; Tifl γ , transcription intermediary factor 1 γ ; TRIM, tripartite motif proteins

*Correspondence to: Inserm UMR 866, UFR des Sciences de Santé, Université de Bourgogne, 7 boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon, France.

E-mail address: Laurent.Delva@u-bourgogne.fr (L. Delva).

ABSTRACT

Transcription Intermediary Factor 1 γ (Tif1 γ) is a member of the tripartite motif family. We showed previously by using a conditional Tif1 γ knock out in the hematopoietic compartment that Tif1 γ deficiency in hematopoietic stem cells (HSCs) led to severe defects in hematopoiesis, recapitulating predominantly the human chronic myelomonocytic leukemia. We also demonstrated that Tif1 γ is involved in hematopoietic aging through the TGF β signaling. Nevertheless, how TIF1 γ contributes to the terminal stages of myeloid differentiation still remained to be clarified. Here, we reveal the crucial role for Tif1 γ expression in the control of mature granulo-monocytic differentiation. An important component of Tif1 γ -deficient mice constituted an alteration of myeloid differentiation, as characterized by dysplastic features, abnormal granulocyte and monocyte maturation, and the expansion of immature CD11b⁺Ly6G^{high}Ly6C^{low} myeloid cells, which share common features with polymorphonuclear-myeloid derived suppressor cells (PMN-MDSCs). This population exhibits high levels of S100A8, S100A9, and Stat3, suggesting their role in progression of the disease. Moreover, In Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ mice, we observed in association with the lack of Csf-1 receptor, the alteration of CSF-1-mediated macrophage differentiation. Altogether, these results indicate that the deficiency in Tif1 γ leads to the expansion of a subset of myeloid cells characterizing the myelodysplastic/myeloproliferative neoplasm.

Keywords:

Tif1 γ

Granulo-monocytopoiesis

PMN-MDSC-like

Macrophage differentiation

Myelodysplastic/myeloproliferative disease

1. Introduction

Transcription Intermediary Factor 1 γ , TIF1 γ (also known as tripartite motif protein TRIM33 or ectodermin), is a member of the transcriptional intermediary factor 1 family [1,2]. A high number of tripartite motif (TRIM) proteins including Tif1 γ are important regulators of tumorigenesis [3]. The tumor suppressive function of Tif1 γ has been revealed in pancreas tumors, hepatocarcinoma, head and neck cancers, non-small cell lung cancers, renal cell carcinoma, and glioblastoma [4-11] whereas its oncogenic activity was so far only identified in colorectal cancer [12].

We have shown that loss of Tif1 γ in mouse hematopoietic stem cells (HSCs) leads to severe defects in hematopoiesis from the HSC compartment to myeloid lineages [13,14]. At older age (>6 months), all *Tif1 γ* -deficient mice exhibit an accumulation of mature granulocytes and monocytes in peripheral blood, bone marrow, liver, and spleen [14]. This phenotype recapitulates predominantly the human chronic myelomonocytic leukemia (CMML) that is observed in patients older than 50 (mean age, 70-years old), and associates proliferative and dysplastic features. TIF1 γ level was very low and almost undetectable in leukemic cells of ~35% of CMML patients. *TIF1 γ* decreased expression is not due to gene mutation but to the gene promoter hypermethylation. TIF1 γ is admitted to be a crucial regulator of transcription during hematopoiesis [15-17] and a stimulator of transcriptional elongation at promoters of genes involved in erythroid differentiation [18,19]. Tif1 γ deletion affects the transition from very primitive progenitors to common myeloid progenitors, and contributes to a selective expansion of the granulo-monocytic progenitors [13].

TIF1 γ has been implicated in TGF β signaling through its binding to phosphorylated Smad 2/3 [15,20] and Smad 4, the central component of TGF β signals, in order to promote its ubiquitination [21-23]. The TIF1 γ ubiquitin ligase function necessitates binding to histones [24] thus involving epigenetic regulation in the guidance of Smad localization at the promoter of TGF β target genes. Moreover, Tif1 γ , depending on its sumoylation status [25] controls the TGF β -induced epithelial-to-mesenchymal transition in mammary epithelial cells [26], and during terminal differentiation of mammary alveolar epithelial cells and lactation [27] via inhibition of Smad 4 activity. We also recently reported that Tif1 γ regulates the TGF β 1 receptor turnover via its ubiquitin ligase activity, this control prevents aging of hematopoietic stem cells (HSCs) [13]. Furthermore, TIF1 γ interacts with and ubiquitinates nuclear beta-catenin [4].

In this study, we sought to further expand our understanding of the *Tif1 γ* control of myeloid mature cell development. Here, we show that *Tif1 γ* is closely involved in the differentiation of granulocytes, monocytes, and macrophages. *Tif1 γ* -deficiency that leads to a mixed myeloproliferative/myelodysplastic neoplasm is largely characterized by the marked expansion of granulocytic and monocytic cell types, reflecting various stages of differentiation. Our study establishes that a crucial component of *Tif1 γ* -deficient mice represents deregulated granulo-monocytic and macrophage differentiation, as characterized by alteration of myeloid cell maturation and subsequent accumulation of CD11b⁺Ly6G^{high}Ly6C^{low} myeloid cells.

2. Materials and methods

2.1. Mice

Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ mice have been previously described [14]. Mice were housed in a pathogen-free animal facility at the Bourgogne University (Dijon, France). Animal studies were performed in accordance with the Bourgogne University Ethics Committee. Genotyping of mice was performed as previously described [13].

2.2. Blood analysis

Automated counts (MS laboratories) were carried out on blood collected from the tail into sample citrate-coated tubes (BD Vacutainer). Blood smears were stained with May-Grünwald-Giemsa (MGG) solution.

2.3. Cell preparation

Following sacrifice of mice, organs were collected for further cell and histopathology analyses. For the bone marrow (BM) cell preparations, femurs and tibias were removed aseptically and cells were flushed. For splenocytes, spleens were dilacerated, red blood cells were lysed and cells were washed in 1×PBS (Lonza).

2.4. Purification of bone marrow myeloid cells and *in vitro* culture

BM myeloid cells were purified by negative selection using FITC-conjugated anti-B220/CD3 ϵ /Ter119/CD49b and anti-FITC magnetic beads (Miltenyi Biotec Inc.). Magnetic cell sorting with the MACS system (Miltenyi Biotec Inc.) leads to a myeloid cell enrichment. For *in vitro* differentiation of purified myeloid cells, cells were seeded in RPMI 10% FBS and 1% PSA at a concentration of 1.5×10^6 cells/well in 6-well tissue culture plates for 2 days, in the presence of 20 ng/mL CSF-1 and 50 ng/mL IL-3 (PromoKine), and 48 h later cells were incubated with 100 ng/mL CSF-1. Until day 7, CSF-1 was added each day at the same concentration. Dendritic cells were also produced from purified myeloid cell cultures supplemented with 10 ng/mL murine GM-CSF and IL-4 (PromoKine) at day 1, 3 and 5 of the culture. Cell differentiation was analyzed by the inverted phase contrast microscope Primo Vert (Carl Zeiss). Images were captured using an AxioCam MRc5 camera (Carl Zeiss), and processed using AxioVision release 4.8 software (Carl Zeiss).

2.5. Flow cytometric analysis and cell sorting

To determine cell distribution in BM, femurs and tibias were cut at the mid-diaphysis and the epiphysis removed. Then, BM cells were flushed out from the distal cut end and red blood cells were lysed using a 5.5 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA buffer. Then, cells were stained with CD45-FITC, CD11b-PB, F4/80-PE, CD11c-FITC, Ly6C-APC, Ly6G-PC7, CD115-APC antibodies, purchased from BD Biosciences or BioLegend, in the dark for 40 min at 4°C. Stained cells were analyzed on a LSRII (BD) or sorted on a FACSAria (BD) machine. Geometric mean fluorescence intensities were analyzed in FlowJO software (Tree Star Inc.). After cytopins, cells were stained by the MGG method.

2.6. Histology and immunohistochemical staining

Sectioned femoral bone marrow, spleens and skin were fixed during 72 h in 10% neutral buffered formalin, dehydrated in alcohol, cleared in xylene, and infiltrated with paraffin on an automated processor (Leica tp1020). Tissue sections (4 μ m thick) were placed on charged slides, deparaffinized in xylene, cleared through graded alcohol solutions, rehydrated in water and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Immunohistochemical (IHC) staining was performed on paraffin-embedded tissue sections using primary antibodies

directed against MPO (Dako), F4/80 (Serotec), B220 (BD) or CD3 (Abcam). Slides were completely digitized using the Hamamatsu Nanozoomer Digital Pathology slide scanner.

2.7. Primers for RT-qPCR

The TaqMan[®] assays were the following: *MafB* (Mm00627481_s1), *Spi-1/PU.1* (Mm03048233_m1), *Egr-2* (Mm00456650_m1), *Klf4* (Mm00627481_s1), *S100A8* (Mm00496696_m1), *S100A9* (Mm00656925_m1), *Stat3* (Mm01219775_m1), *IL4R α* (Mm01275139), *Arginase-1* (Mm00475988), *IL-6* (Mm00446190), *TNF- α* (Mm00443258), *C/ebp β* (Mm00488140), *C/ebp α* (Mm00843434). Values for each PCR were normalized with *Hprt1* (Mm03024075_m1). For the study of *cfms*, *Mcp1*, *Mip1 α* , *Mip1 β* , and *Mip2* expressions, real-time PCR was performed in a 7500 FAST thermocycler (Applied Biosystems) using SyBr Green detection protocol as outlined by the manufacturer. Mouse forward and reverse primers were: *cfms*, 5'-CATGGCCTTCCTTGCTTCTAAA-3' and 5'-CAGCACGTTTCGAGCTGCTA-3'; *Mcp1*, 5'- GAGCATCCACGTGTTGGCT-3' and 5'-TGGTGAATGAGTAGCAGC-3'; *Mip1 α* , 5'- TCTTCTCAGCGCCATATGGA-3' and 5'-CGTGGAATCTTCCGGCTGTAG-3'; *Mip1 β* , 5'- TCTTGCTCGTGGCTGCC-3' and 5'-GGGAGGGTCAGAGCCCAT-3'; *Mip2*, 5'- GCCCCCAGGACCCCA-3' and 5'-CTTTTTGACCGCCCTTGAGA-3'. *Hprt1* was used as internal control.

2.8. RNA isolation and real-time quantitative PCR

Total RNA was isolated from peripheral blood, BM or sorted splenic cells, by using TRIzol reagent (Invitrogen) or Nucleospin RNA II kit (MACHEREY-NAGEL), according to the manufacturer's instructions. Complementary DNA was obtained from 150 ng of total RNA using M-MLV Reverse Transcriptase (Promega). RQ-PCR was performed in triplicates using TaqMan probes (Applied Biosystems) and analyzed in an Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System.

2.9. MCP-1 plasmatic concentration

Blood was collected from the tail into sample citrate-coated tubes (BD Vacutainer) and centrifuged at room temperature and 2,000g during 20 min in order to obtain the plasma.

MCP-1 plasmatic concentration was measured using ELISA kits (Elisa Ready-SET-Go; eBioscience) according to the manufacturer's instructions. The signal was read at 450 nm on a Biochrom Asys UVM340 microplate reader with the Digiread software (Biochrom).

2.10. Analysis of immunosuppressive activity

As positive control of immunosuppressive activity of spleen MDSCs on T lymphocytes, we used thymoma-bearing mice obtained by subcutaneous injection of 1×10^6 of EL4 cells [30]. To purify splenic myeloid cells from control, Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ and EL4 mice, cells were sorted by positive selection. Suspensions of splenocytes were obtained by spleen dilaceration. Cells were incubated with magnetic micro-beads conjugated with anti-mouse Gr-1-PE-Cy7 (BD), followed by positive magnetic selection with the AutoMacs (Miltenyi Biotec Inc.) according to the manufacturer's instructions. Splenic T lymphocytes from control mice were incubated with magnetic micro-beads conjugated with anti-mouse Pan T Cell-Biotin (Miltenyi Biotec Inc.), followed by negative magnetic selection with the AutoMacs (Miltenyi Biotec Inc.). Enriched CD3⁺ T cells were stained with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (Invitrogen) and grown in 96-well plates alone or in association with beads coated with anti-mouse CD3/CD28 (to induce T cell activation and proliferation), or in association with beads and splenic Gr-1⁺ cells from control, Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ or EL4 mice (Gr-1⁺/T cell ratio of 1:2, 1:5, 1:10 or 1:20), at 37°C with 5% CO₂ for 5 days. Then, cells were labeled with CD3-FITC, CD25-PE, CD8-PE-Cy7 and CD4-APC antibodies. T lymphocyte subsets were analyzed using a LSRII flow cytometer. The supernatants of control, Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ or EL4 Gr1⁺ cells, cultured at 37°C with 5% CO₂ for 1 day were collected. The levels of TGF β and IL-10 were measured using ELISA kits (Elisa Ready-SET-Go; eBioscience) according to the manufacturer's instructions. The signal was read at 450 nm on a Biochrom Asys UVM340 microplate reader with the Digiread software (Biochrom).

2.11. Cytokine determination in cell cultures stimulated with LPS

Cell cultures were stimulated with 1 μ g/mL LPS at day 5 of CSF-1-treatment. After incubation for 48 h, supernatants were harvested and assayed by commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits. ELISA (Elisa Ready-SET-Go; eBioscience) measured the production of IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, MCP-1, and TNF α .

according to the manufacturer's instructions. The signal was read at 450 nm on a Biochrom Asys UVM340 microplate reader with the Digiread software (Biochrom).

2.12. Measurement of apoptosis

Apoptosis was measured by flow cytometer with Annexin-V-FITC, 7-AAD and Caspase-3. Annexin-V and 7-AAD were diluted (1:100) with 1X binding buffer, incubated during 15 min at room temperature before analysis with the LSRII flow cytometer. For caspase-3, cells were permeabilized with Saponin, incubated during 10 min at room temperature. Primary antibody was then added and a new incubation of 1 hour was necessary. Finally, 100 μ L of a 1 \times PBS /1 \times BSA/Saponin/1 mL cyanin 5 mix were added, incubated during 40 min at room temperature before analysis with the LSRII flow cytometer.

2.13. Migration assay

Cell migration was evaluated using 12-well Transwell plates (Millicell, Millipore) at day 5 of culture. Adherent cells (0.4×10^6) were added to the upper chamber of each well. The lower chamber contained RPMI supplemented with 10% FBS and 1% PSA. Transwell plates were incubated at 37°C for 24 h. The medium of the upper chamber was then removed and plates were washed with 1 \times PBS prior to be fixed with 100% methanol for 10 min at -20°C. Cells were stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenyl-indole) at a 1:1000 dilution in 1 \times PBS for staining of nuclei. The Transwell membranes were removed and placed cell-side up on glass slides, with glycerol/1 \times PBS (9:1). Slides were viewed with a Leica DMRB compound microscope (Leica Microsystems).

2.14. Determination of nitric oxide production

Cells were cultured in presence of CSF-1 at a density of 1.5×10^6 cells/well for 5 days. At day 5, LPS (1 μ g/mL) was added. Nitrite production was measured in the supernatant of cultured macrophages using the Griess reaction. Briefly, equal volumes (100 μ L) of treated culture supernatant and Griess reagent (1% sulphanilamide, 0.1% N-1-naphthylethylenediamine, and 5% orthophosphoric acid) were mixed and incubated at room temperature for 5 min, and the absorbance was measured at 540 nm in a microplate reader

(Biochrom). The concentration of nitrite in the sample was determined using a sodium nitrite standard curve.

2.15. Phagocytosis assay

Cells were cultured in presence of CSF-1 at a density of 1.5×10^6 cells/well for 5 days. At day 5, cells were incubated with fluorescein-labeled *Escherichia coli* bioparticles and intracellular uptake was quantified with a LSRII flow cytometer by measuring fluorescence emitted by engulfed particles.

2.16. Statistical analysis

Statistical significance was analyzed using the two-tailed Student t-test or analysis of variance. Differences were considered significant when *p*-values were less than .05. In all cases, * represents *p* less than .05; **, *p* less than .01; and ***, *p* less than .001.

3. Results

3.1. In $Tif1\gamma^{\Delta/\Delta}$ mice, the expansion of an immature granulocytic population with a PMN-MDSC phenotype is identified

Six to ten month-old $Tif1\gamma^{\Delta/\Delta}$ mice were examined for manifestation of disease and by measuring serial blood counts. $Tif1\gamma^{\Delta/\Delta}$ mice revealed myelogenous hyperplasia in bone marrow (not shown and [14]), with an increased circulating neutrophils and monocytes, and a concomitant reduction of circulating lymphocytes (Fig. 1).

CD11b is a broadly expressed integrin subunit that is found on neutrophils, monocytes, macrophages and some dendritic cell subsets. Immunophenotype analyses using the CD11bLy6C marker combination were performed to examine myeloid populations. CD11b⁺Ly6C⁺ cells were markedly expanded in $Tif1\gamma^{\Delta/\Delta}$ mice both in peripheral blood and bone marrow (Fig. 2A). This population expressed more the Ly6C^{low} marker and displayed lower granularity (SSC^{low}). Mice exhibited an atypical myeloid population indistinguishable from neutrophils or monocytes, resembling neutrophilic band cells. Even if some pleomorphic nuclei were observed, in most cases, cells were ring-shaped, with morphology closed to

metamyelocytes (Fig. 2B and Supplemental Fig. 1). To further characterize this myelogenous population, we used flow cytometry to precisely discriminate neutrophils ($\text{SSC}^{\text{high}}\text{CD45}^+\text{CD11b}^+\text{Ly6G}^+\text{Ly6C}^{\text{low}}$) from resident monocytes ($\text{SSC}^{\text{low}}\text{CD45}^+\text{CD11b}^+\text{Ly6G}^-\text{Ly6C}^{\text{low}}$) or inflammatory monocytes ($\text{SSC}^{\text{low}}\text{CD45}^+\text{CD11b}^+\text{Ly6G}^-\text{Ly6C}^{\text{high}}$), according to the former classification. We found that in bone marrow the frequency of $\text{CD11b}^+\text{Ly6G}^{\text{low}}\text{Ly6C}^{\text{high}}$ was lower for both control and $\text{Tif1}\gamma^{\Delta/\Delta}$ mice (Fig. 2C). In contrast, the percentage of circulating $\text{CD11b}^+\text{Ly6G}^{\text{high}}\text{Ly6C}^{\text{low}}$ myeloid cells was found higher in $\text{Tif1}\gamma^{\Delta/\Delta}$ mice (Fig. 2C). These results may suggest that in control mice, the $\text{CD11b}^+\text{Ly6G}^{\text{high}}\text{Ly6C}^{\text{low}}$ cells will give rise to circulating granulocytes whereas a high number of abnormal $\text{CD11b}^+\text{Ly6G}^{\text{high}}\text{Ly6C}^{\text{low}}$ myeloid cells are still present in the peripheral blood of $\text{Tif1}\gamma^{\Delta/\Delta}$ sick mice, because of their inability to differentiate into normal granulocytes.

Mouse MDSCs (Myeloid derived suppressor cells) correspond to a heterogeneous cell population, composed of $\text{CD11b}^+\text{Gr1}^+$ cells. Two subsets have been described according to the differential expression of Ly6C and Ly6G. Mononuclear monocytic MDSCs (M-MDSCs) are immunophenotypically characterized as $\text{CD11b}^+\text{Ly6G}^{\text{low}}\text{Ly6C}^{\text{high}}$ whereas polymorphonuclear granulocytic (PMN) MDSCs are $\text{CD11b}^+\text{Ly6G}^{\text{high}}\text{Ly6C}^{\text{low}}$ [28-30]. These populations do not exist in healthy normal mouse while in mice with tumors PMN-MDSCs can represent a population of pathologically activated precursors of neutrophils which are characterized by immunosuppressive activity [31,32]. We therefore carried out molecular studies to evaluate whether the immature population observed in $\text{Tif1}\gamma^{\Delta/\Delta}$ mice has the phenotype of PMN-MDSCs (Fig. 3). We analyzed for the expression of the transcription factor *Stat3* (*signal transducer and activator of transcription 3*), a critical regulator of MDSC functional activity that is overexpressed in both human and murine-derived MDSCs [33], S100A8 and S100A9 known to promote the accumulation and retention of MDSCs [34] and IL-4R α shown to be upregulated on MDSC in a high number of murine tumors [35]. Some of these MDSC markers were significantly increased in $\text{Tif1}\gamma^{\Delta/\Delta}$ mice, in total WBC or on $\text{Ly6G}^{\text{high}}$ sorted circulating cells (Fig. 3A) or in splenic cells (Supplemental Fig.2). In addition, $\text{Tif1}\gamma^{\Delta/\Delta}$ mice exhibited a significant increase in plasma level of pro-inflammatory factor MCP-1 (Fig. 3B), and we furthermore observed a higher level of TGF β , but not IL-10 in the supernatant of $\text{Tif1}\gamma^{\Delta/\Delta}$ Gr1^+ cells (Fig. 3C). All these parameters are present in PMN-MDSC phenotype. M-MDSCs are established to be a very high immunosuppressive population in comparison with PMN-MDSCs that conversely are usually represented as the most common subset that accumulates during tumor progression [36]. Thus, we decided to

perform a T cell suppression assay with $Tif1\gamma^{\Delta/\Delta}$ splenic Gr-1⁺ cells. In our experimental conditions, $Tif1\gamma^{\Delta/\Delta}$ cells were not suppressive (Supplemental Fig.3a and 3B). This lack of immunosuppression could be due, at least partially, to the fact that arginase-1 was not deregulated (data not shown). Altogether, these results indicate that a low expression of $Tif1\gamma$ provokes the production of immature granulocytic cells, which share common features with PMN-MDSCs and do not seem to harbor myeloid immunosuppressive activity *in vitro*.

3.2. *Tif1 γ is critical in controlling granulo-monocytopoiesis*

The hyperplasia of the myeloid lineage at various maturation stages was confirmed with peripheral blood smear analysis (Fig. 4A). These mice had comparable erythrocyte and platelet counts and no variation in hemoglobin concentration compared to control mice (Fig. 1). The anomalies of the peripheral blood were associated with myeloproliferative syndrome [14]. *Tif1 γ* -deficient mice exhibited an enlarged spleen [14] and extra-medullary hematopoiesis, and the skin was also infiltrated with myeloid cells (Fig. 4B). Immunohistochemistry and flow cytometry analyses revealed a progressive disorganization in spleen architecture with a progressive loss of white pulp and an infiltration of granulocytic cells (Fig. 4C). The decrease in the number of lymphocytes in peripheral blood of $Tif1\gamma^{\Delta/\Delta}$ mice prompted us to investigate the cellular component of the spleen. As assessed by a staining with anti-CD3 and anti-B220 antibodies, a decrease in T and B cells was observed in spleen of $Tif1\gamma^{\Delta/\Delta}$ mice (Fig. 5A). The presence of dysplastic megakaryocytes and erythroblasts furthermore testified to the compensation of bone marrow failure (Fig. 5B). We also examined finely the peripheral blood to determine the possibility of other morphological evidence of cell dysplasia. Peripheral blood smears from $Tif1\gamma^{\Delta/\Delta}$ mice showed a marked elevation in nucleated erythrocytes or erythrocytes harboring Howell-Jolly bodies as well as the presence of abnormal shaped erythrocytes (poikilocytes) and stomatocytes (Fig. 5C). Other abnormalities in granulocytes, such as hyposegmentation of the nucleus called pseudo Pelger-Huët anomaly or hypersegmentations were observed (Fig. 5C). Finally, a myelofibrosis associated with an increase of intramedullary adipocytes was also observed in the marrow (data not shown).

3.3. Macrophage production and activity are altered in *Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$* mice

We previously reported that *cfms* expression was significantly decreased by the loss of *Tif1 γ* , which could account for the altered production of peritoneal macrophages observed in *Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$* mice. These cells did not adhere to the plastic and were morphologically abnormal *in vitro* [14]. To assess further macrophage maturation, we first examined tissue macrophage content in control and *Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$* mice by staining bone marrow, spleen, liver, and skin with the marker F4/80 (Fig. 6). F4/80-positive cells were markedly reduced in bone marrow from *Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$* mice. In *Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$* spleens exhibiting histological disorganization, splenic macrophage/histiocytic cells were also reduced. Contrary to splenic macrophages, the number of resident hepatic F4/80+ Kupffer cells was increased. Finally, the number of macrophages in skin was also higher in *Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$* mice. Altogether, this analysis suggests the deregulation of macrophage production *in vivo*. *Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$* cells expressed low level of the CD115 receptor (*cfms*) for the CSF-1 (M-CSF) cytokine (Fig. 7A). To examine whether *Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$* myeloid cells displayed an altered differentiation into macrophages, after a negative depletion of B, T, NK, and red cells from bone marrow cells, immature and mature myeloid cells were cultured in presence of the recombinant CSF-1. *Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$* cells showed extreme difficulties to differentiate into macrophages, with a delay observed *in vitro* (Fig. 7B). Although adherent cells were present, these cells seemed dysmorphic *in vitro* (Fig. 7B). MGG staining showed that adherent cells corresponded to two different populations, i.e. morphological macrophage-like cells and immature myeloid cells (Fig.7C). Therefore, the observed dysmorphism (Fig.7B) corresponds to the alteration of surface mechanical properties of the *Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$* cells. After 5 days of culture, *Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$* adherent cells were not expressing the F4/80 marker (Fig. 7D). Cells were also analyzed for apoptosis and no difference was noticed between the two cell populations (Fig. 7E).

A similar absence of dendritic cell differentiation of *Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$* myeloid cells was noticed when myeloid cells were treated with GM-CSF and IL-4 (Supplemental Fig.4A). However, cells entered into apoptosis (Supplemental Fig. 4B).

To better define the *Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$* -induced alterations in CSF-1-dependent myeloid cell differentiation *in vitro*, we quantified transcript levels of genes involved in the commitment of monocytes into macrophages (Fig. 8A, Supplemental Fig.6). Levels of *Egr2*, *MafB*, *Klf4*, *C/ebp α* , *C/ebp β* were decreased during CSF-1 treatment. Expression of *Sp1/Pu.1* was less affected while it was significantly reduced at day 0. Therefore, *Tif1 γ* inactivation leads to

overall deregulation of essential transcription factors implicated in macrophage differentiation.

To examine the function of the resulting cells after CSF-1 treatment of $Tif1\gamma^{\Delta/\Delta}$ myeloid cells *in vitro*, cells were stimulated by lipopolysaccharides (LPS). The production of MCP-1 (CCL2), IL-6, IL-1 β , TNF α , and IL-10 was measured during 48 hours (Fig. 8B). $Tif1\gamma^{\Delta/\Delta}$ -produced cells secreted very low levels of IL-6, IL-10, and negligible amounts of MCP-1, IL-1 β , and TNF α . Expression of *Mip1 α* , *Mip1 β* , and *Mcp1* was reduced while *Mip2* (*Cxcl2*) was highly increased (Fig. 8C). This latter observation is critical since *Mip2* is known to increase potential neutrophil recruitment, participating to myeloid cell infiltration. Therefore, the generated $Tif1\gamma^{\Delta/\Delta}$ cells displayed perturbation in cytokine secretion after LPS stimulation *in vitro*.

The migratory capacity of adherent cells obtained after CSF-1 stimulation was evaluated by the transwell migration assay (Fig. 9A). $Tif1\gamma$ -deficient macrophages had significantly lower migratory capacity than control cells. LPS is capable of activating macrophages for NO production. To evaluate whether the NO production was affected in $Tif1\gamma^{\Delta/\Delta}$ cells obtained from CSF-1-cultivated monocytes, we investigated NO production in the cell culture supernatants upon treatment of cells with LPS. After 12 hours, levels of NO $_2^-$ were significantly lower in $Tif1\gamma^{\Delta/\Delta}$ cell culture supernatants compared with that of control cells (Fig. 9B). We also tested the effect of a lack of $Tif1\gamma$ on phagocytic activity compared with control macrophages. CSF-1-cultivated cells were incubated with fluorescein-labeled *E coli* K-12 bioparticles (Fig. 9C). $Tif1\gamma^{\Delta/\Delta}$ cells engulfed fewer particles, indicating that they had significantly reduced phagocytic activity compared with control macrophages.

Altogether, these results demonstrate a critical alteration of normal differentiation from immature myeloid cells into macrophages in presence of CSF-1 *in vitro*. This abnormal differentiation is associated with the lack of CSF-1 receptor and is reflected by the analysis of macrophage subsets *in vivo*.

4. Discussion

In this study, we provided the essential role for $Tif1\gamma$ expression in the control of mature myeloid differentiation, and we identified the development of an immature granulocytic population harboring common features with PMN-MDSCs at phenotypic and

molecular levels in *Tif1 γ* -deficient mice. We also observed an alteration of macrophage differentiation due to the loss of *Tif1 γ* expression.

Several studies have revealed a pivotal role for *Tif1 γ* in regulating hematopoiesis [13-19]. Regarding myelopoiesis, these findings were obtained from *Tif1 γ* knockout mice, which exhibit a myeloproliferative phenotype characterized by a high number of granulocytes or monocytes [14,17,19]. We identified cells morphologically similar to promyelocytes with granulocytic and monocytic characteristics. These cells are CD11b⁺Ly6G^{high}Ly6C^{low} as PMN-MDSCs. M-MDSCs are characterized by the CD11b⁺Ly6G^{low}Ly6C^{high} phenotype [30]. M-MDSCs are established to be a very immunosuppressive population in comparison with PMN-MDSCs that conversely are usually represented as the most common subset that accumulates during tumor progression [36]. Thus, we decided to carry out a T cell suppression assay with *Tif1 γ ^{Δ/Δ}* splenic Gr1⁺ cells. In our experimental conditions, the cells harboring a high number of molecular characteristics of PMN-MDSCs were not suppressive (data not shown). We confirmed the presence of this cell type in sick *Tif1 γ ^{Δ/Δ}* mice. We did not observe modifications of plasmatic growth factor levels such as CSF-1 in mice [14]. We hypothesized that the development of cells with a PMN-MDSC phenotype could result from the deregulation of transcription factor expression involved in myelopoiesis, and observed that *Egr2*, *Spi-1/Pu.1* or *Cebp α* , *C/ebp β* are markedly decreased in *Tif1 γ ^{Δ/Δ}* bone marrow myeloid cells.

Stat3 expression is higher in *Tif1 γ ^{Δ/Δ}* Ly6G sorted cells. Stat3 is known to regulate arginase-1 activity in the control of the immunosuppressive function of MDSCs [37] and to promote angiogenesis through an increase of the pro-angiogenic growth factor VEGF [38]. However, we did not detect arginase-1 in *Tif1 γ ^{Δ/Δ}* mice. Interestingly, we also identified an increased gene expression of both *S100A8* and *S100A9* in *Tif1 γ ^{Δ/Δ}* mice, either in circulating blood or in splenic cells (not shown). It was reported that *S100A8* and *S100A9* are negatively regulated during differentiation of myeloid progenitors in macrophages and dendritic cells [34]. Overexpression of *S100A9* inhibits dendritic and macrophage differentiation from myeloid progenitors whereas differentiation of myeloid progenitors in MDSCs is induced. In addition, a high expression of *S100A9* obtained via an animal model recapitulates features of human myelodysplastic syndromes [39]. Therefore the high level of *S100A9* may participate to the development of the myelodysplastic phenotype in *Tif1 γ ^{Δ/Δ}* mice. The results obtained from co-cultures of T cells along with purified Ly6G *Tif1 γ ^{Δ/Δ}* splenic myeloid cells did not establish the immunosuppression of T cells, resulting at least partially to the fact that

arginase-1 was not deregulated. We do not rule out indirect capacities of these immature granulocytic cells to harbor immunosuppressive functions since we observed the production of TGF β , tumor abilities through S100A8 and S100A9 overexpression, and pro-angiogenic properties via increased concentrations of plasmatic MCP-1.

Tif1 γ is an essential factor for myelopoiesis including the later stages of maturation. The low expression of Csf1r previously observed [14] and confirmed here, prompted us to hypothesize that macrophage differentiation alterations could result from this deregulation. Nevertheless, since we observed that GM-CSF failed to induce dendritic cell differentiation *in vitro* even though gm-csfr was not affected by Tif1 γ deficiency, we could postulate that this differentiation failure was due to overexpression of various MDSC markers including S100A9. Hence, a lower expression of Tif1 γ may alter normal macrophage or dendritic cell differentiation, not only because of a deregulation of specific transcription factors, but also as a result of the subsequent induction of S100A8 and S100A9, leading to the development and expansion of an immature granulocytic population with a phenotype of PMN-MDSCs at the expense of macrophage and dendritic cells.

Overall, the results of this work support the conclusion that Tif1 γ is involved in late stages of granulo-monocytopoiesis and macrophage differentiation. A low expression of Tif1 γ could participate in the development of abnormal immature granulocytic cells that could interfere with the development of malignant diseases. Indeed, hypermethylation of *TIF1 γ* gene promoter leading to gene expression down-regulation has been identified in 35% of CMML patients [14]. The analogy between the Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ mouse model and human CMML urges us to investigate immune response escape in disease emergence and progression, and to determine the presence of specific MDSC markers and/or MDSCs in patients. In that case, future therapeutic notions could be taken into account, namely the targeting of MDSCs to promote antitumor immune responses.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge Julien Guy (Laboratory of hematology of Dijon hospital), Laurent Martin (Pathology department of Dijon hospital), and Amandine Bataille (Cell imagery platform, Université de Bourgogne-Franche-Comté, Dijon) for assistance. We also thank Eric Solary for helpful discussion. This work was supported by research funding from a French government grant managed by the National Research Agency (ANR-12-BSV1-0001-01), the National Research Agency under the program Investissements d'Avenir (ANR-11-LABX-0021, LipSTIC Labex), the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), the Ligue contre le Cancer (Conférence de Coordination Inter-Régionale du Grand Est), the association Cent pour Sang la Vie, and the Conseil Régional de Bourgogne (CRB) (PARI). R.Z.M. was supported by fellowships from the French Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur (MRES) and the Société Française d'Hématologie (SFH), R.A. by the Ligue de Saône-et-Loire Contre le Cancer, the ARC and the SFH, A.L. by fellowships from the Inserm associated with the CRB and the SFH, and R.Q. by fellowships from the ANR, the ARC, and the CRB.

Figure 1

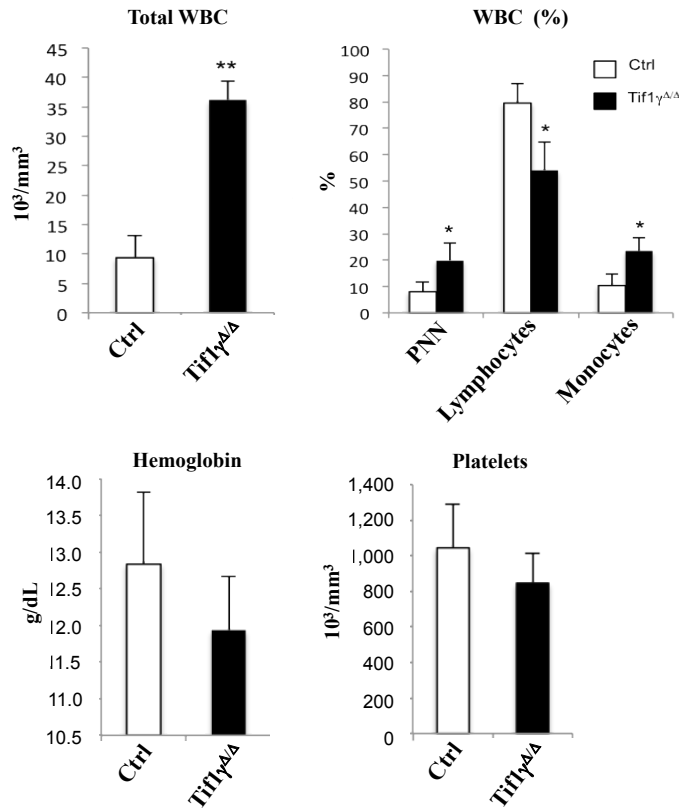


Fig. 1. Tif1 γ deficiency induces abnormal neutrophil and monocyte proliferation. Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ mice show an increased number of circulating neutrophils and monocytes, associated with less lymphocytes. Total peripheral blood leukocytes (WBC), neutrophils (PNN), lymphocytes, monocytes, hemoglobin level, and platelets were measured in 6-10 month-old control (n=6) and Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ (n=10) mice that developed the disease. Data are presented as the mean \pm SEM. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

Figure 2

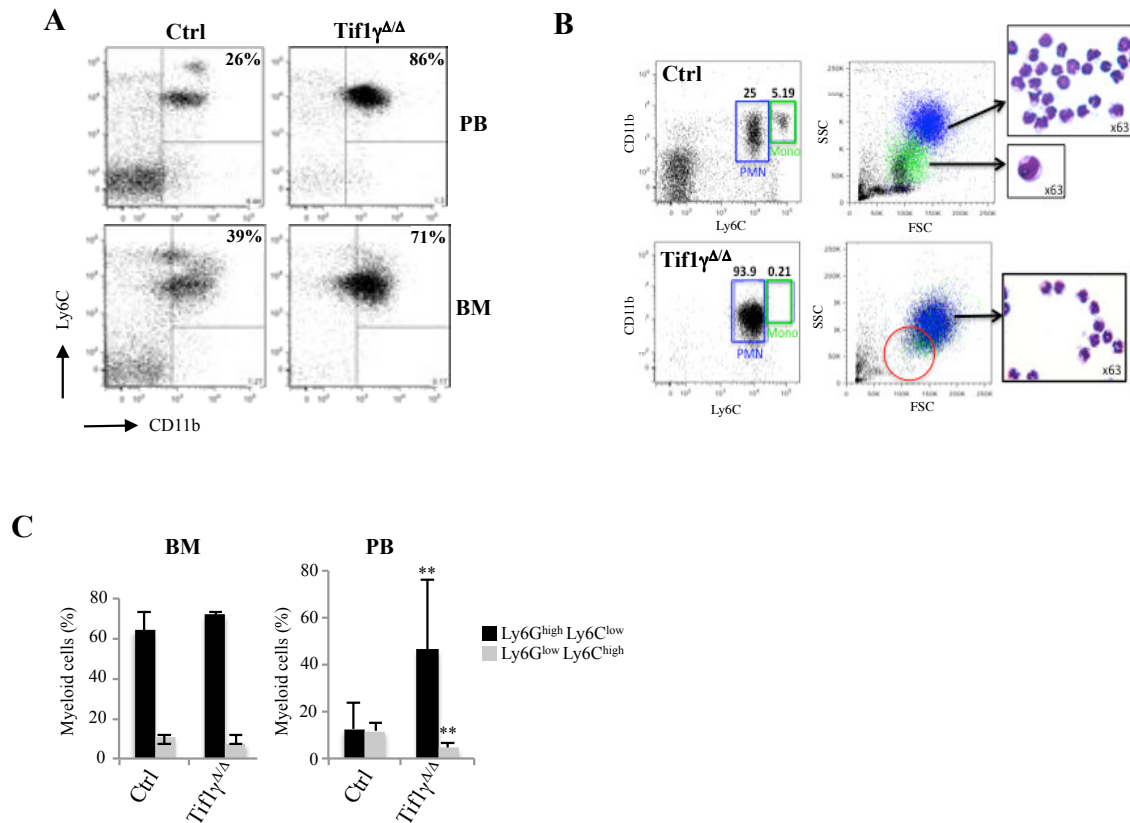


Fig. 2. Tif1 γ deficiency provokes abnormal differentiation of neutrophils and monocytes. (A) CD11b⁺ Ly6C⁺ myeloid cells are expanded in Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ mice. Immunophenotype analyses using CD11b Ly6C antibodies in control (n=5) and Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ (n=5) mice that developed the disease. CD11b⁺ Ly6C⁺ cells were increased in Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ mice either in peripheral blood (PB) or bone marrow (BM). A representative experiment is shown. (B) Tif1 γ deficiency confers a proliferative advantage to a population of immature granulocytes. Representative immunophenotype analysis of peripheral blood using CD11b Ly6C and representative MGG staining of peripheral blood smear from a control or Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ mouse that developed the disease are shown. (C) The frequency of circulating CD11b⁺ Ly6G^{high} Ly6C^{low} myeloid cells is increased in Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ mice. Left panel, immunophenotype analyses using CD45, CD11b, Ly6C, and Ly6G antibodies in control (n=3) and Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ (n=3) mice that developed the disease. The frequency of CD11b⁺ Ly6G^{low} Ly6C^{high} and CD11b⁺ Ly6G^{high} Ly6C^{low} BM cells is indicated. Right panel, immunophenotype analyses using CD45, CD11b, Ly6C, and Ly6G antibodies in control (n=9) and Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ (n=7) mice that developed the disease. The frequency of CD11b⁺ Ly6G^{low} Ly6C^{high} and CD11b⁺ Ly6G^{high} Ly6C^{low} PB cells is indicated. Data are presented as the mean \pm SEM. **, $p \leq 0.01$

Figure 3

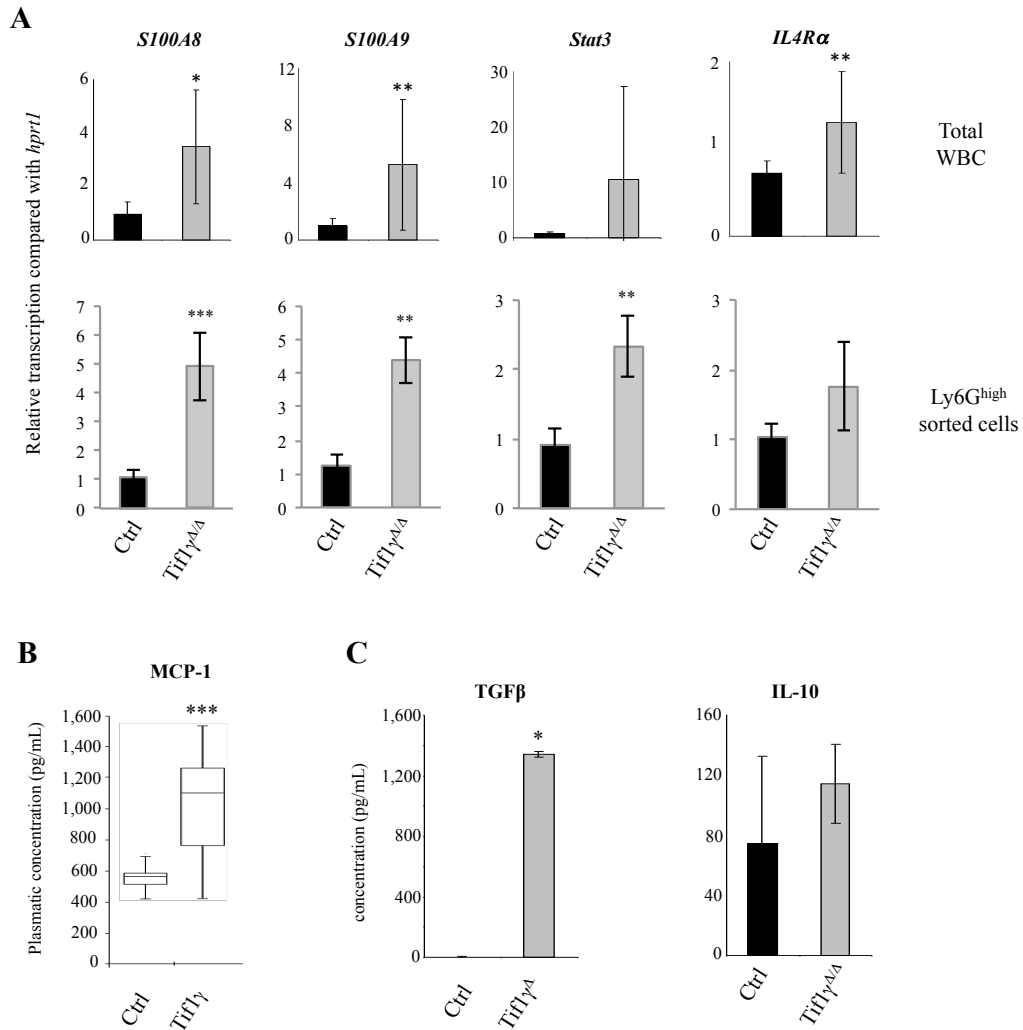


Fig. 3. Tif1 γ deficiency leads to an increase of MDSC genes. (A) RNA was extracted from circulating cells (WBC) or Ly6G^{high} sorted circulating cells obtained from control mice (WBC, n=9; Ly6G^{high} cells, n=3) or Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ mice (WBC, n=13; Ly6G^{high} cells, n=3), and analyzed by quantitative real-time PCR. Expression level of *S100A8*, *S100A9*, *Stat3*, and *IL4R α* was measured. Data are presented as the mean \pm SEM. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$. (B) Tif1 γ deficiency leads to an increase of plasmatic MCP-1. Plasma concentration of MCP-1 from control (Ctrl) (n=11) or Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ (n=10) mice was measured by ELISA. Data are presented as the mean \pm SEM. ***, $p \leq 0.001$. (C) Splenic Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ Gr1⁺ cells promote secretion of TGF β . Supernatants of splenic Gr1⁺ cells from control (n=3) or Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ (n=3) mice that developed the disease were collected for detecting cytokine concentration (TGF β , IL-10) using ELISA assay. Data are presented as the mean \pm SEM. *, $p \leq 0.05$.

Figure 4

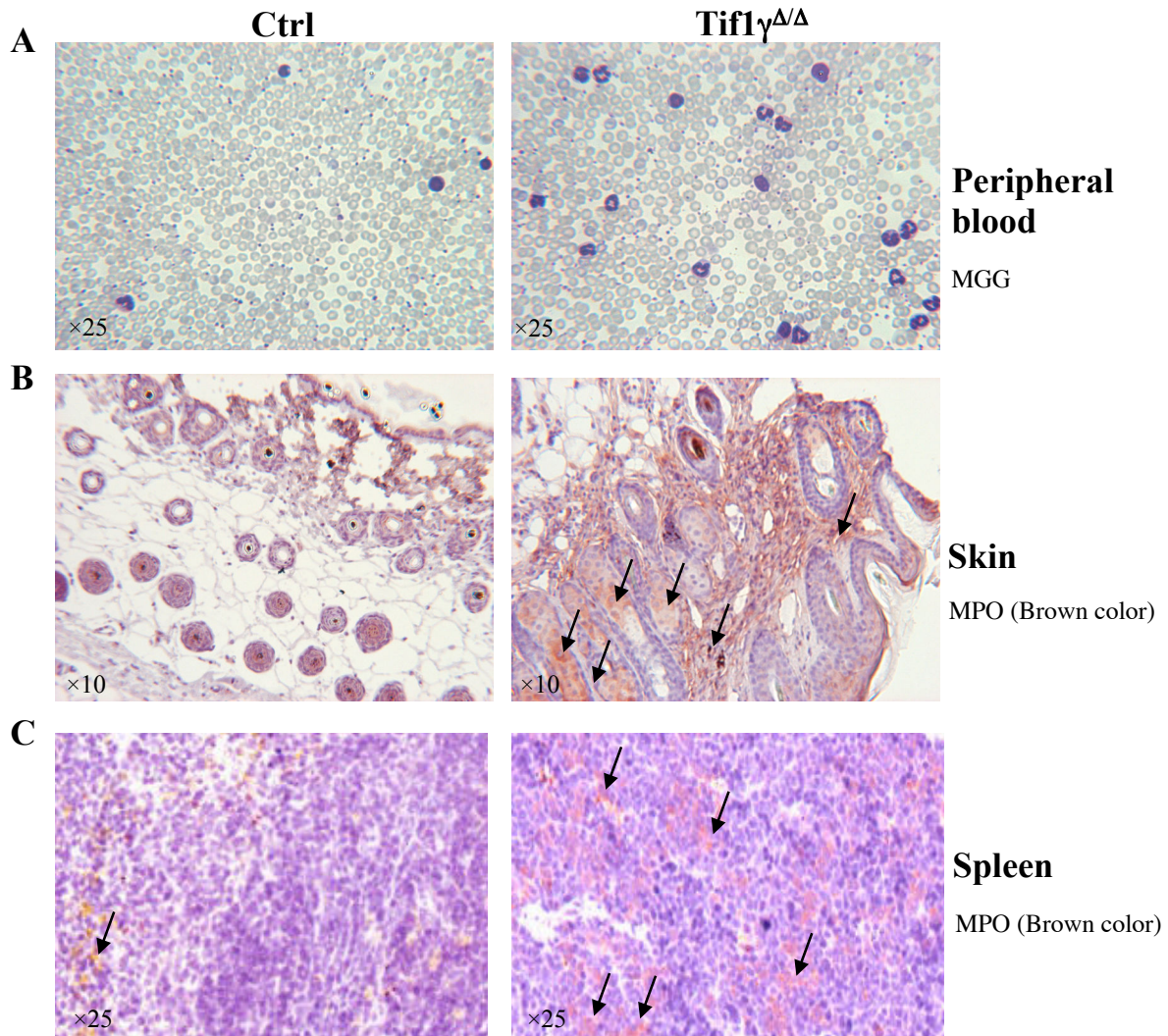


Fig. 4. *Tif1γ* deficiency induces infiltration of myeloid cells in various tissues. (A) Myeloid hyperplasia is observed. Representative MGG staining of peripheral blood smear from a control or *Tif1γ*^{Δ/Δ} mouse that developed the disease. (B) *Tif1γ* deficiency leads to the infiltration of MPO positive myeloid cells in skin. Hematoxylin-eosin staining of formalin-fixed skin sections from control (Ctrl) or *Tif1γ*^{Δ/Δ} mouse that developed the disease. IHC staining was performed on paraffin-embedded tissue sections using anti-MPO. (C) *Tif1γ* deficiency induces the infiltration and/or proliferation of MPO positive myeloid cells in spleen. Hematoxylin-eosin staining of formalin-fixed spleen sections from control (Ctrl) or *Tif1γ*^{Δ/Δ} mouse that developed the disease. IHC staining was performed on paraffin-embedded tissue sections using anti-MPO.

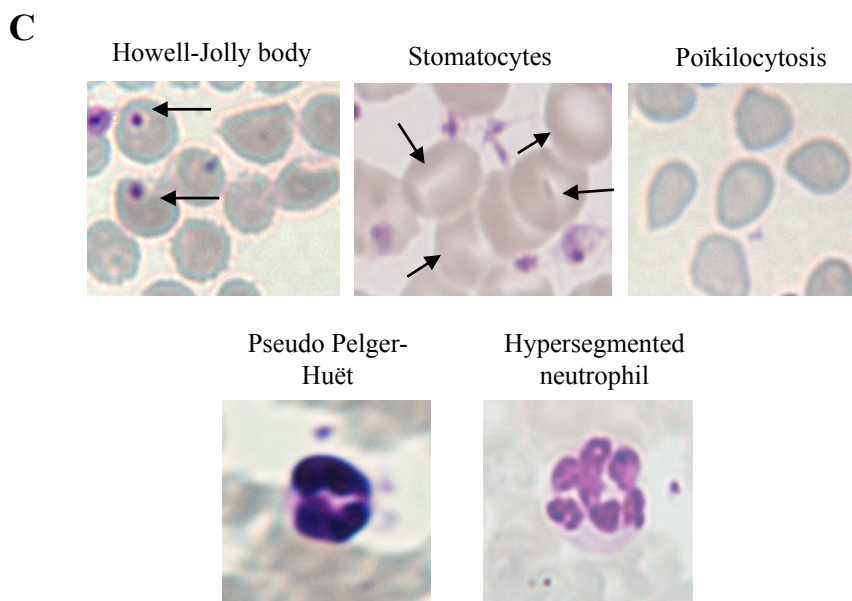
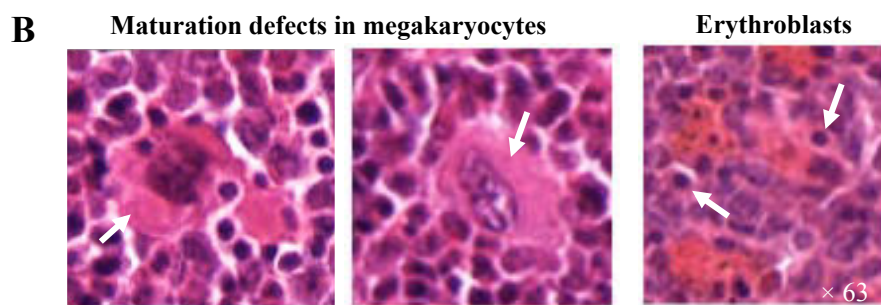
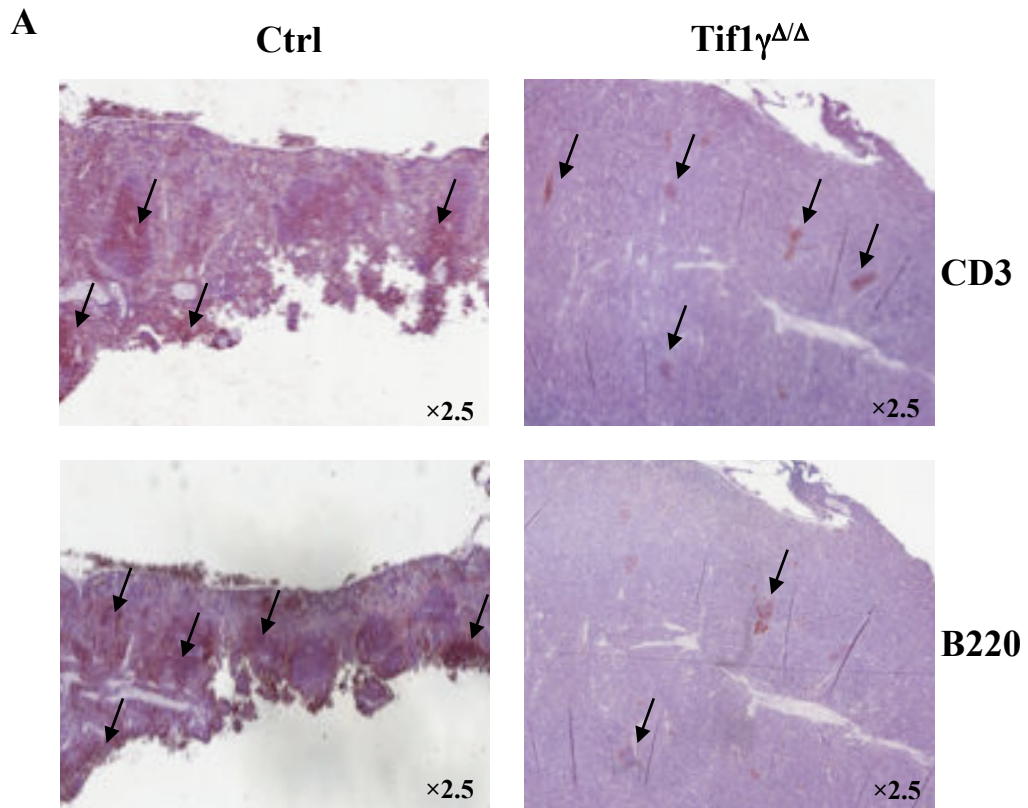


Figure 5

Fig. 5. $Tif1\gamma$ deficiency induces the decrease of T and B cells, an extramedullary hematopoiesis in spleen, and myelodysplastic features. (A) Hematoxylin-eosin staining of formalin-fixed spleen sections from control (Ctrl) or $Tif1\gamma^{\Delta/\Delta}$ mouse that developed the disease. IHC staining was performed on paraffin-embedded tissue sections using anti-CD3 or anti-B220. (B) The presence of megakaryocytes, dysplastic megakaryocytes, and erythroblasts is noticed. Hematoxylin-eosin staining of formalin-fixed spleen sections from $Tif1\gamma^{\Delta/\Delta}$ mouse that developed the disease. (C) Peripheral blood smear showing many cytomorphological myelodysplastic features in a mouse that developed the disease.

Figure 6

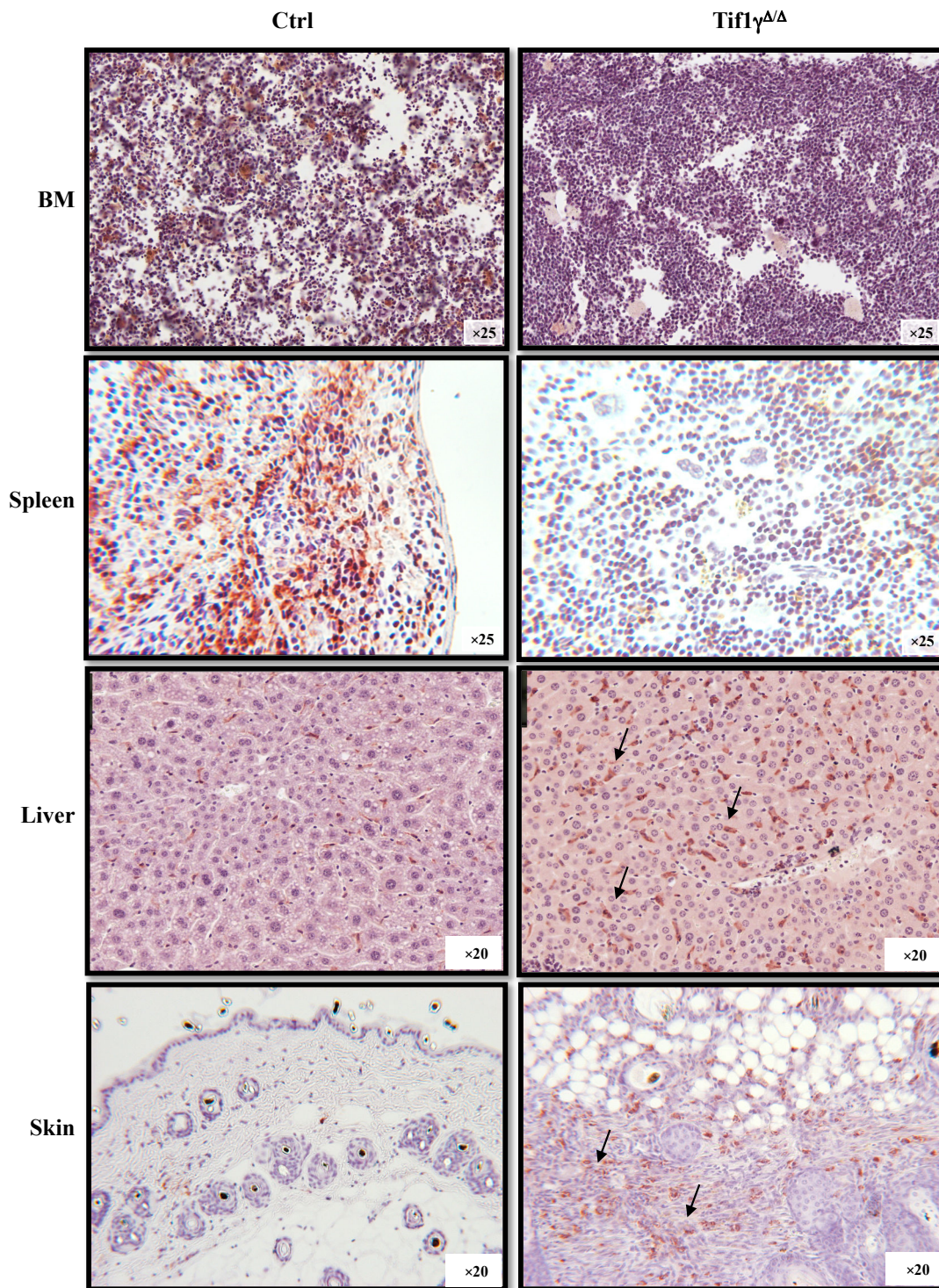


Fig. 6. $Tif1\gamma$ deficiency leads to an abnormal production of macrophages *in vivo*. Hematoxylin-eosin staining of formalin-fixed spleen sections from control (Ctrl) or $Tif1\gamma^{\Delta/\Delta}$ mouse that developed the disease. IHC staining was performed on paraffin-embedded tissue sections (bone marrow (BM), spleen, liver, skin) using F4/80

Figure 7

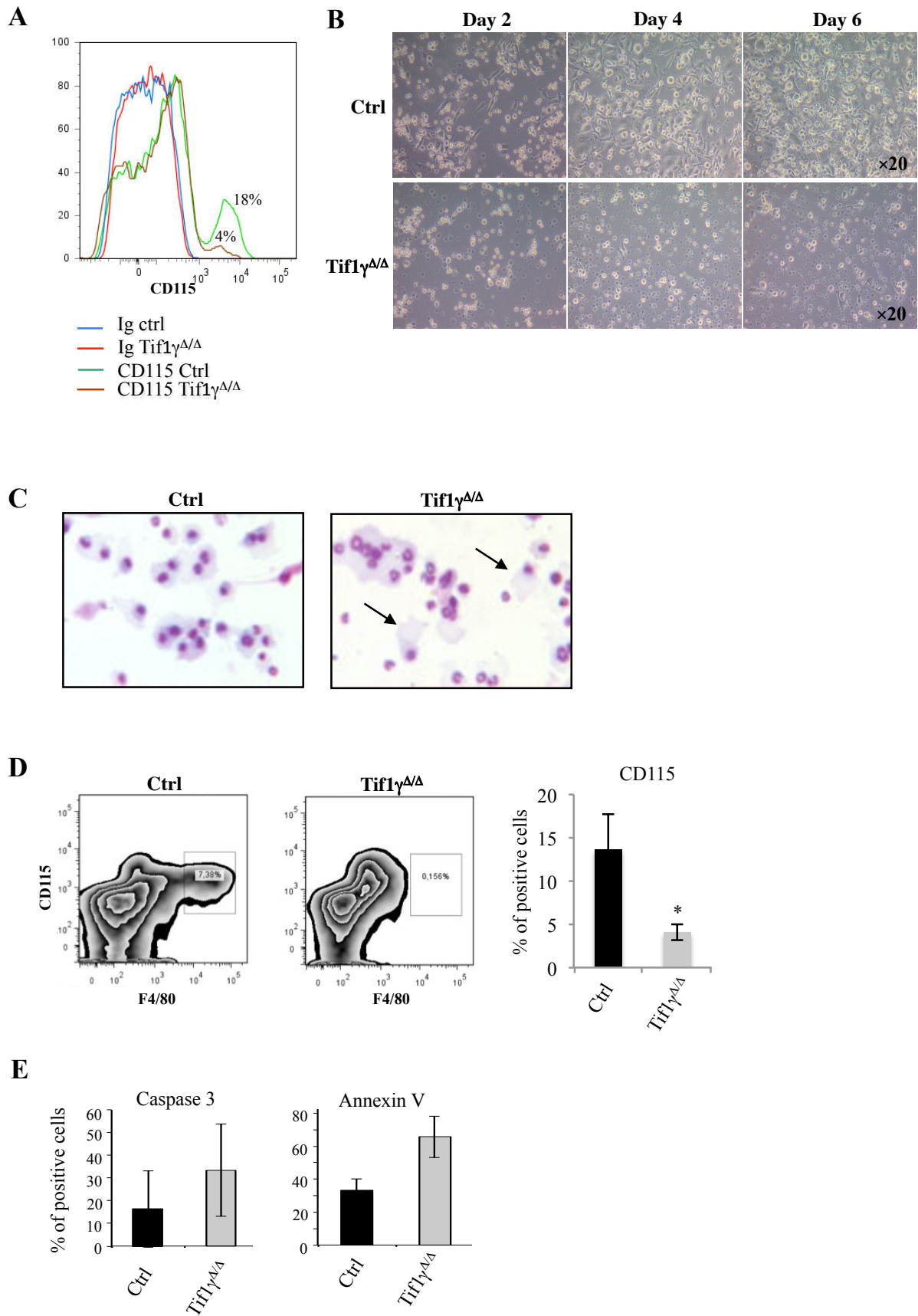


Fig. 7. $Tif1\gamma^{\Delta/\Delta}$ bone marrow myeloid cells displayed an altered differentiation of myeloid cells into macrophages upon CSF-1 treatment *in vitro*. (A) There is a decrease in CSF-1 receptor in $Tif1\gamma^{\Delta/\Delta}$ bone marrow myeloid cells. Immunophenotype analyses of bone marrow myeloid cells using CD115 antibody in control (Ctrl) and $Tif1\gamma^{\Delta/\Delta}$ mice that developed the disease. (B) The CSF-1-dependent macrophage differentiation is altered in $Tif1\gamma^{\Delta/\Delta}$ mice *in vitro*. Bone marrow myeloid cells were treated during 6 days with CSF-1. Phase contrast microscopy analysis at day 2, 4, and 6 of control (Ctrl) or $Tif1\gamma^{\Delta/\Delta}$ cells from mouse that developed the disease are shown. (C) Representative MGG staining of cells from control (Ctrl) or $Tif1\gamma^{\Delta/\Delta}$ BM cells after 5 days upon CSF-1 treatment. Arrows indicate cells looking like macrophages. (D) Left panel, the resulting $Tif1\gamma^{\Delta/\Delta}$ cells after CSF-1 treatment do not harbor CD115/F4/80 double immunostaining. Immunophenotype analyses of cells after 5 days of CSF-1 treatment using CD115 and F4/80 antibodies in control (Ctrl) or $Tif1\gamma^{\Delta/\Delta}$ cells. Right panel, the resulting $Tif1\gamma^{\Delta/\Delta}$ cells after CSF-1 treatment exhibit less CD115 immunostaining (n=3). Data are presented as the mean \pm SEM. *, $p \leq 0.05$. (E) Measurement of caspase-3 and annexin V on myeloid cells treated with CSF-1. There was no difference between control (Ctrl) and $Tif1\gamma^{\Delta/\Delta}$ cells (n=2) upon CSF-1 treatment in the percentage of apoptotic cells. Data are presented as the mean \pm SEM

Figure 8

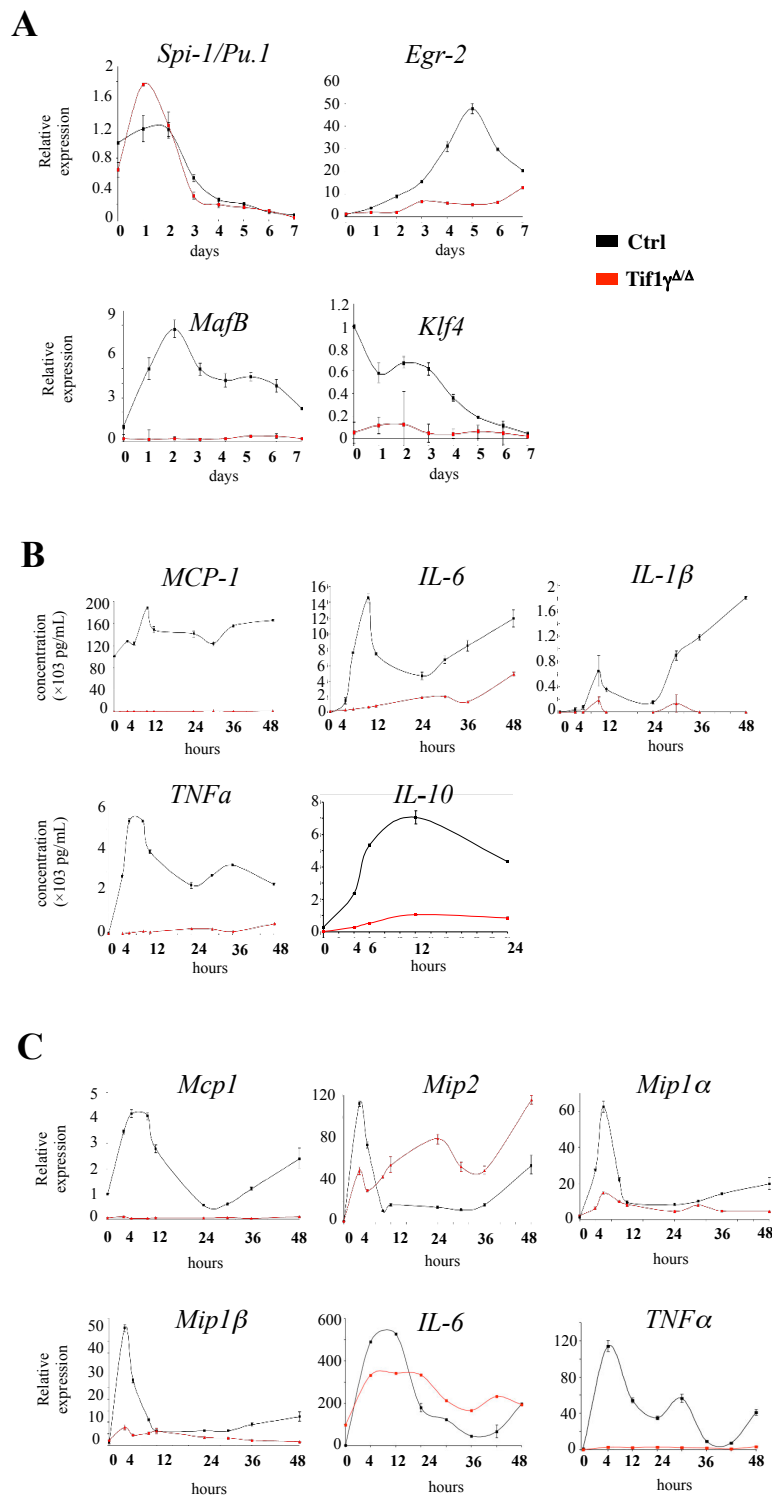
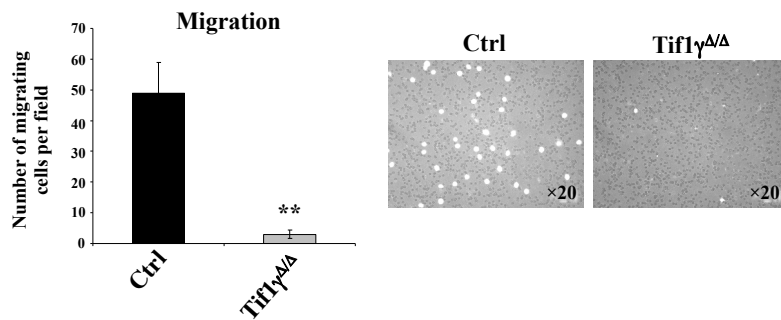


Fig. 8. *Tif1 γ* deficiency leads to the deregulation of essential transcription factors implicated in macrophage differentiation, and a lack of functional activity for the *Tif1 $\gamma^{\Delta\Delta}$* cells produced upon CSF-1 treatment. (A) Loss of *Tif1 γ* induces a deregulation of genes associated with macrophage differentiation. RNA was extracted from control or *Tif1 $\gamma^{\Delta\Delta}$* BM myeloid cells, in

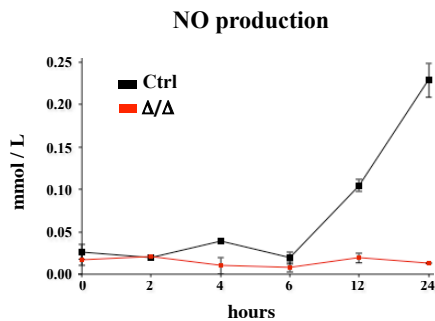
absence or upon CSF-1 treatment (from day 1 to 7), and analyzed by quantitative real-time PCR. Expression level of *Spi-1/PU.1*, *Egr-2*, *MafB*, and *Klf4* was measured (one out of two independent experiments). Data are presented as the mean of triplicates \pm SEM. (B) Loss of Tif1 γ induces an alteration of the production of cytokines and chemokines in Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ -generated cells. After 5 days upon CSF-1 treatment, control (Ctrl) and Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ cells were stimulated by LPS. Production of MCP-1, IL-6, IL-1 β , TNF α , and IL-10, measured from the supernatant of macrophages (control: Ctrl) or Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ -generated cells during 48 hrs, was performed by ELISA (one out of three independent experiments). Data are presented as the mean of triplicates \pm SEM. (C) Loss of Tif1 γ induces an alteration of the production of cytokines and chemokines in Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ -generated cells. After 5 days upon CSF-1 treatment, control (Ctrl) and Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ cells were stimulated by LPS. RNA was extracted from macrophages or Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ -generated cells, and analyzed by quantitative real-time PCR. Expression level of *Mcp1*, *Mip2*, *Mip1 α* , *Mip1 β* , *IL-6*, and *TNF α* was measured (one out of three independent experiments). Data are presented as the mean of triplicates \pm SEM.

Figure 9

A



B



C

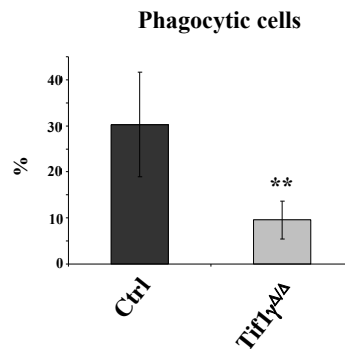
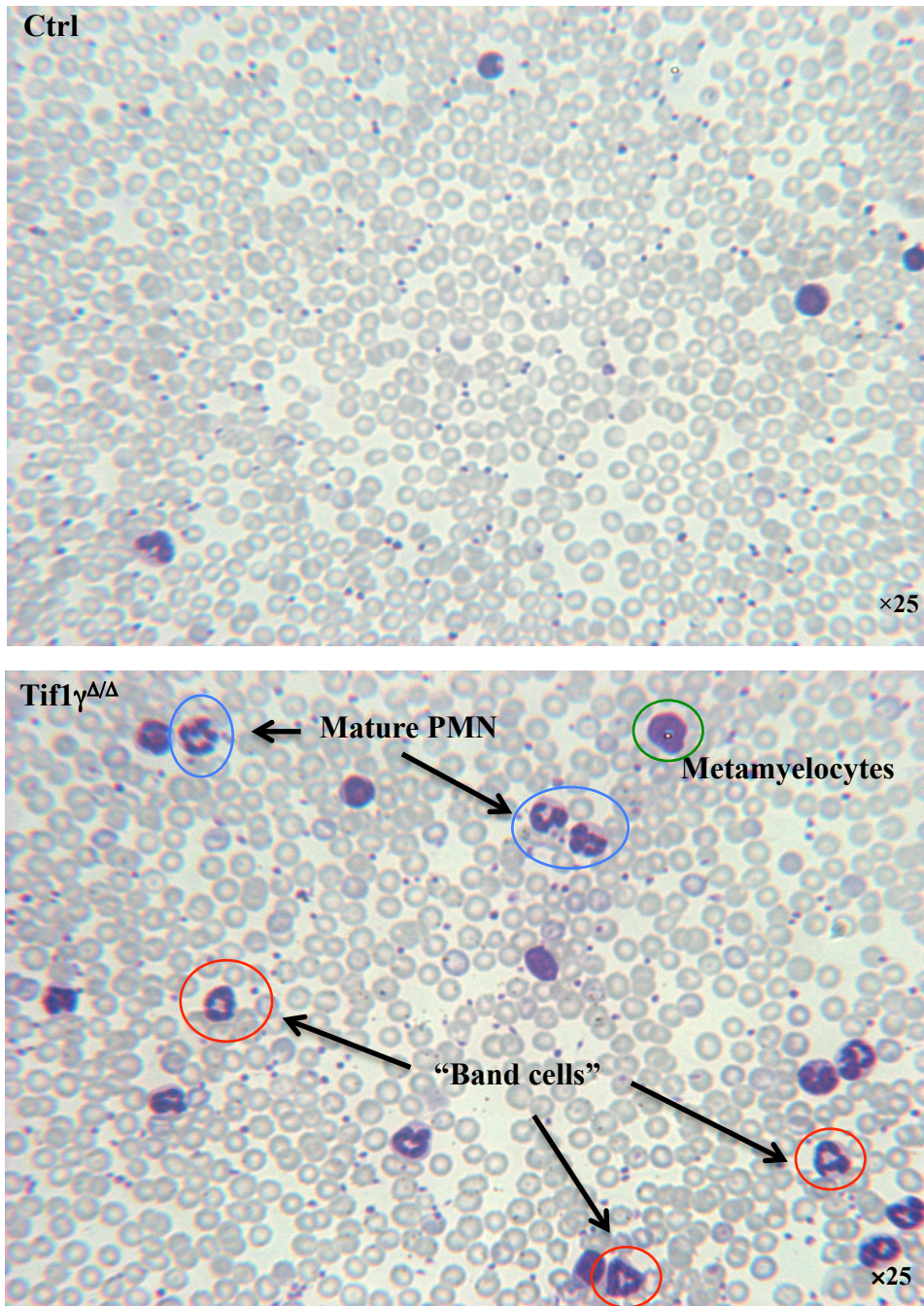


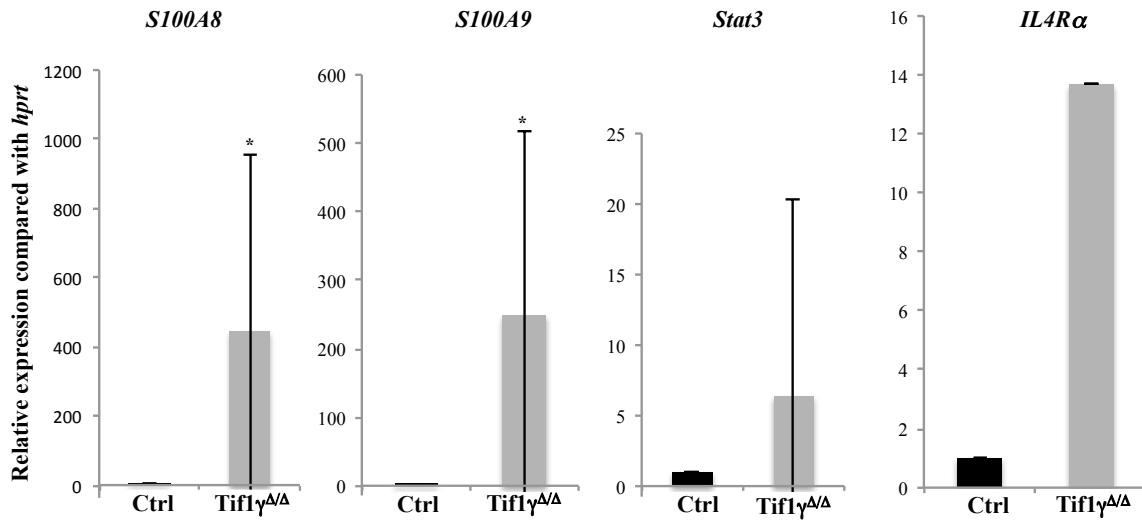
Fig. 9. Macrophage activity is affected by the loss of Tif1 γ . (A) A low number of Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ -CSF-1-dependent generated cells is able to migrate at day 5. Left panel, the number of macrophages (Ctrl) or Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ -produced cells able to migrate through transwell filters is indicated (n=3). Data are presented as the mean \pm SEM. **, $p \leq 0.01$. Right panel, a representing phase contrast microscopy analysis of macrophages (Ctrl) or Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ -produced migrating cells at day 5 of CSF-1 treatment is shown. After migration through transwell filters, cells were fixed and stained for nuclei (DAPI). (B) Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ -CSF-1-dependent generated cells do not produce NO. At day 5 of CSF-1 treatment, cells were treated with LPS and NO production was measured in the culture media at different times (one out of three independent experiments). Data are presented as the mean of triplicates \pm SEM. (C) Phagocytosis function of Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ -CSF-1-dependent generated cells is reduced. Phagocytosis of fluorescein-labeled *E coli* BioParticles by macrophages (Ctrl) or Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ -produced cells was quantified by measuring intracellular fluorescence emitted by engulfed particles (n=3). Data are presented as the mean \pm SEM. **, $p \leq 0.01$.

Supplemental figure 1



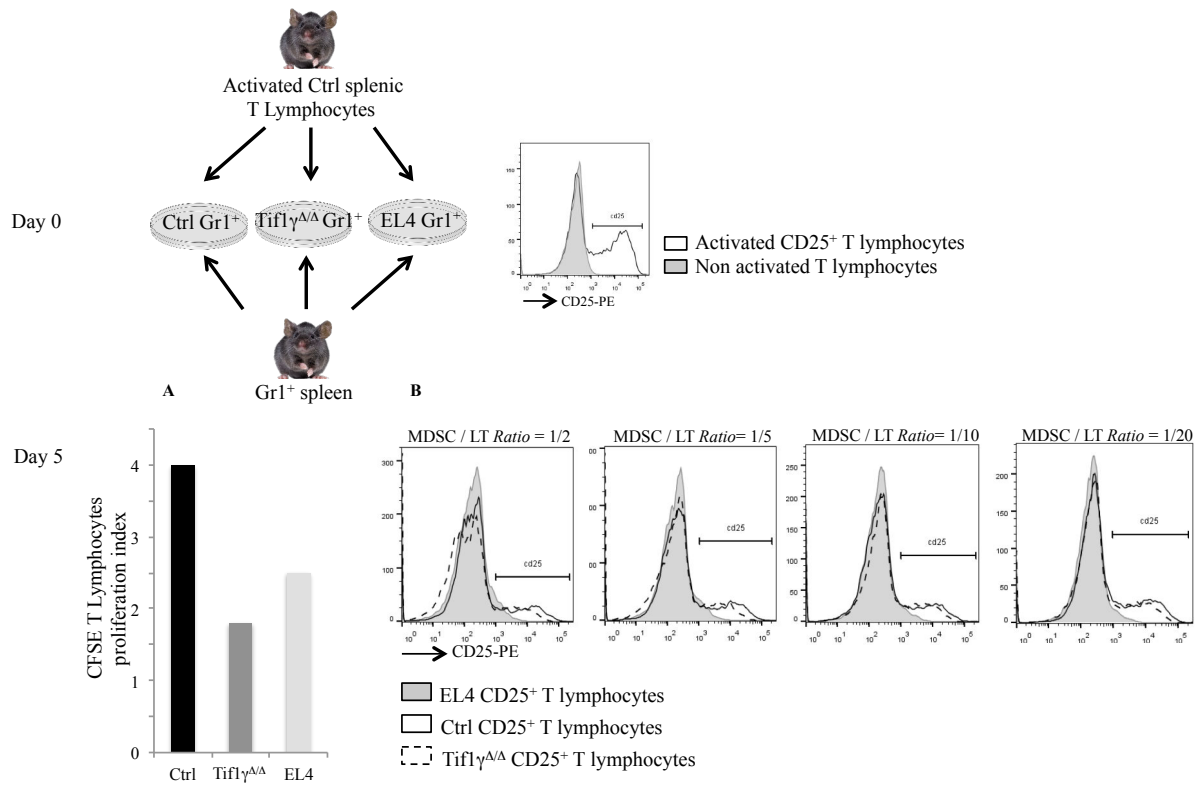
Supplemental Fig. 1. *Tif1 γ* deficiency confers a proliferative advantage to a population of immature granulocytes. Representative MGG staining of peripheral blood smear from a control or *Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$* mouse that developed the disease are shown.

Supplemental figure 2



Supplemental Fig. 2. *Tif1γ* deficiency leads to an increase of MDSC genes in Gr1⁺ sorted splenic cells. RNA was extracted from splenic cells obtained from control mice (Ctrl) (n=7) or *Tif1γ*^{Δ/Δ} mice (n=7), and analyzed by quantitative real-time PCR. Expression level of *S100A8*, *S100A9*, *Stat3*, and *IL4Rα* was measured. Data are presented as the mean ± SEM. *, $p \leq 0.05$.

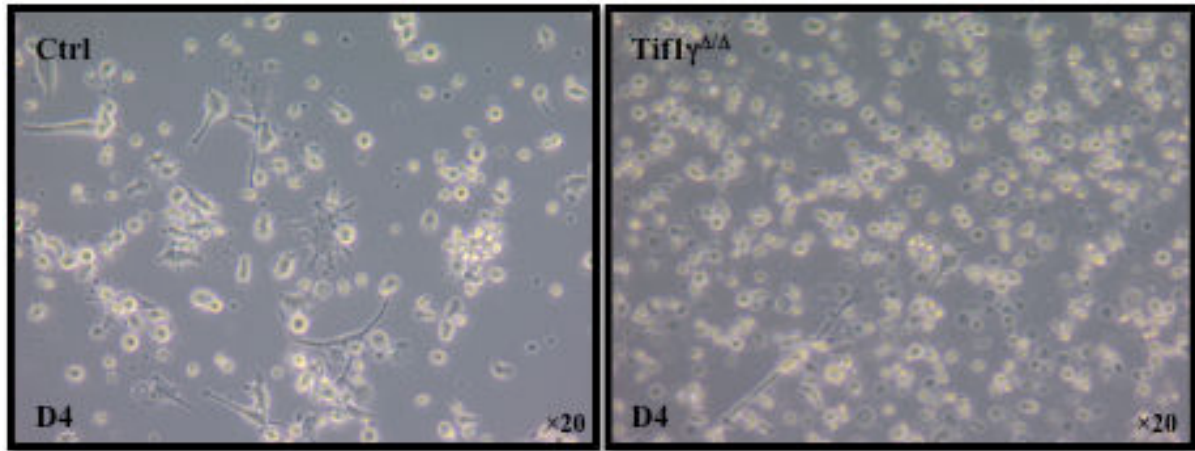
Supplemental figure 3



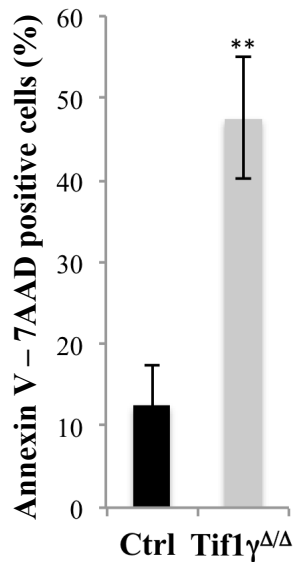
Supplemental Fig. 3. Gr1⁺ Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ cells do not exhibit suppressive activity against T cells. (A) CFSE-labeled pan-T cells were cocultured at a 1:2, 1:5, 1:10, 1:20 *ratio* with Gr1⁺ spleen cells from control mice (Ctrl), Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ mice or EL-4 mice (positive control). There is no difference in T cell proliferation. (B) Analysis of T cell activation (CD25⁺) does not show any difference.

Supplemental figure 4

A

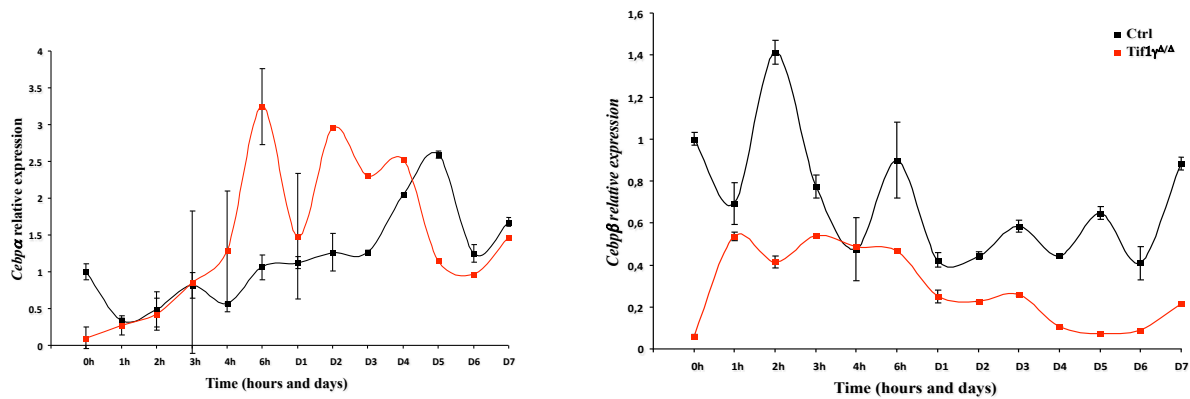


B



Supplemental Fig. 4. The GM-CSF-dependent dendritic cell differentiation is altered in Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ mice *in vitro*. (A) Bone marrow myeloid cells were treated during 7 days with GM-CSF and IL-4. Phase contrast microscopy analysis at day 4 of control (Ctrl) or Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ cells from mouse that developed the disease are shown. (B) Apoptosis was induced during *in vitro* dendritic cell differentiation of Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ cells. Measurement of annexin V/7-AAD on myeloid cells (n=3) treated with GM-CSF. The number of apoptotic cells was higher during *in vitro* Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$ GM-CSF dendritic cell differentiation in comparison with control cells (Ctrl). Data are presented as the mean \pm SEM. **, $p \leq 0.01$.

Supplemental figure 5



Supplemental Fig. 5. Loss of *Tif1γ* induces a deregulation of genes associated with macrophage differentiation. RNA was extracted from control or *Tif1γ*^{Δ/Δ} BM myeloid cells, in absence or upon CSF-1 treatment (from day 1 to 7), and analyzed by quantitative real-time PCR. Expression level of *Cebpa*, and *Cebpb* was measured (one out of two independent experiments). Data are presented as the mean of triplicates ± SEM.

References

- [1] Venturini L, You J, Stadler M, et al. TIF1gamma, a novel member of the transcriptional intermediary factor 1 family. *Oncogene*. 1999;18(5):1209-1217.
- [2] Yan KP, Dolle P, Mark M, et al. Molecular cloning, genomic structure, and expression analysis of the mouse transcriptional intermediary factor 1 gamma gene. *Gene*. 2004;334:3-13.
- [3] Hatakeyama S. TRIM proteins and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(11):792-804.
- [4] Xue J, Chen Y, Wu Y, et al. Tumour suppressor TRIM33 targets nuclear β -catenin degradation. *Nat Commun*. 2015;6:6156.
- [5] Vincent DF, Yan KP, Treilleux I, et al. Inactivation of TIF1gamma cooperates with Kras to induce cystic tumors of the pancreas. *PLoS Genet*. 2009;5(7):e1000575.
- [6] Herquel B, Ouararhni K, Khetchoumian K, et al. Transcription cofactors TRIM24, TRIM28, and TRIM33 associate to form regulatory complexes that suppress murine hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(20):8212-8217.
- [7] Ding ZI, Jin GN, Wang W, et al. Reduced expression of transcriptional intermediary factor 1 gamma promotes metastasis and indicates poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2014;60(5):1620-1636.
- [8] Li H, Wawrose JS, Gooding WE, et al. Genomic analysis of head and neck squamous cell carcinoma cell lines and human tumors: a rational approach to preclinical model selection. *Mol Cancer Res*. 2014;12(4):571-582.
- [9] Wang L, Lei Z, Liu X, Liu R, Zhang H. [Association of mutation and methylation in the promoter region of TIF1 γ with non-small cell lung cancer]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*. 2013;16(5):227-232.
- [10] Jingushi K, Ueda Y, Kitae K, et al. miR-629 Targets TRIM33 to Promote TGF β /Smad Signaling and Metastatic Phenotypes in ccRCC. *Mol Cancer Res*. 2015;13(3):565-574.
- [11] Kulkarni A, Oza J, Yao M, et al. Tripartite motif-containing 33 (TRIM33) functions in the Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP)-dependent DNA damage response through interaction with Amplified in Liver Cancer-1 (ALC1). *J Biol Chem*. 2013;288(45):32357-32369.
- [12] Jain S, Singhal S, Francis F, et al. Association of overexpression of TIF1gamma with colorectal carcinogenesis and advanced colorectal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol*. 2011;17(35):3994-4000.
- [13] Quéré R, Saint-Paul L, Carmignac V, et al. Tif1 γ regulates the TGF- β 1 receptor and promotes physiological aging of hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(29):10592-10597.
- [14] Aucagne R, Droin N, Paggetti J, et al. Transcription intermediary factor 1gamma is a tumor suppressor in mouse and human chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Invest*. 2011;121(6):2361-2370.
- [15] He W, Dorn DC, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Moore MA, Massagué J. Hematopoiesis controlled by distinct TIF1gamma and Smad4 branches of the TGFbeta pathway. *Cell*. 2006;125(5):929-941.
- [16] Ransom DG, Bahary N, Niss K, Traver D, Burns C, Trede NS, et al. The zebrafish moonshine gene encodes transcriptional intermediary factor 1gamma, an essential regulator of hematopoiesis. *PLoS Biol*. 2004 Aug;2(8):E237.
- [17] Kusy S, Gault N, Ferri F, et al. Adult hematopoiesis is regulated by TIF1gamma, a repressor of TAL1 and PU.1 transcriptional activity. *Cell Stem Cell*. 2011;8(4):412-425.
- [18] Bai X, Kim J, Yang Z, et al. TIF1gamma controls erythroid cell fate by regulating transcription elongation. *Cell*. 2010;142(1):133-143.

- [19] Bai X, Trowbridge JJ, Riley E, et al. TIF1-gamma plays an essential role in murine hematopoiesis and regulates transcriptional elongation of erythroid genes. *Dev Biol.* 2013;373(2):422-430.
- [20] Xi Q, Wang Z, Zaromytidou AI, et al. A poised chromatin platform for TGF-beta access to master regulators. *Cell.* 2011 Dec 23;147(7):1511-24.
- [21] Dupont S, Zacchigna L, Cordenonsi M, et al. Germ-layer specification and control of cell growth by Ectoderm, a Smad4 ubiquitin ligase. *Cell.* 2005;121(1):87-99.
- [22] Dupont S, Mamidi A, Cordenonsi M, et al. FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGFbeta signaling, controls Smad4 monoubiquitination. *Cell.* 2009;136(1):123-135.
- [23] Morsut L, Yan KP, Enzo E, et al. Negative control of Smad activity by ectoderm/Tif1gamma patterns the mammalian embryo. *Development.* 2010;137(15):2571-2578.
- [24] Agricola E, Randall RA, Gaarenstroom T, Dupont S, Hill CS. Recruitment of TIF1gamma to chromatin via its PHD finger-bromodomain activates its ubiquitin ligase and transcriptional repressor activities. *Mol Cell.* 2011;43(1):85-96.
- [25] Fattet L, Ay AS, Bonneau B, et al. TIF1gamma requires sumoylation to exert its repressive activity on TGFbeta signaling. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 16):3713-3723.
- [26] Hesling C, Fattet L, Teyre G, et al. Antagonistic regulation of EMT by TIF1gamma and Smad4 in mammary epithelial cells. *EMBO Rep.* 2011;12(7):665-672.
- [27] Hesling C, Lopez J, Fattet L, et al. Tif1gamma is essential for the terminal differentiation of mammary alveolar epithelial cells and for lactation through SMAD4 inhibition. *Development.* 2013;140(1):167-175.
- [28] Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nature Rev Immunol.* 2012;12(4):253-268.
- [29] Movahedi K, Williams M, Van den Bossche J, et al. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood.* 2008;111(8):4233-4244.
- [30] Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol.* 2008;181(8):5791-5802.
- [31] Kusmartsev S, Gabrilovich DI. Inhibition of myeloid cell differentiation in cancer: the role of reactive oxygen species. *J Leukoc Biol.* 2003;74(2):186-196.
- [32] Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, Montero AJ. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2009;58(1):49-59.
- [33] Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature Rev Immunol.* 2009;9(3):162-174.
- [34] Cheng P, Corzo CA, Luetke N, et al. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J Exp Med.* 2008;205(10):2235-2249.
- [35] Gallina G, Dolcetti L, Serafini P, et al. Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *J Clin Invest.* 2006;116(10):2777-2790.
- [36] Youn JI, Kumar V, Collazo M, et al. Epigenetic silencing of retinoblastoma gene regulates pathologic differentiation of myeloid cells in cancer. *Nature Immunol.* 2013 Mar;14(3):211-220.
- [37] Vasquez-Dunddel D, Pan F, Zeng Q, et al. STAT3 regulates arginase-I in myeloid-derived suppressor cells from cancer patients. *J Clin Invest.* 2013;123(4):1580-1589.

- [38] Kujawski M, Kortylewski M, Lee H, Herrmann A, Kay H, Yu H. Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice. *J Clin Invest.* 2008;118(10):3367-3377.
- [39] Chen X, Eksiöglu EA, Zhou J, et al. Induction of myelodysplasia by myeloid-derived suppressor cells. *J Clin Invest.* 2013;123(11):4595-4611.

DISCUSSION

I. De l'hématopoïèse de stress splénique à la splénomégalie

Le rôle de Tifl γ au cours de l'hématopoïèse a été mis en évidence à plusieurs reprises, notamment au cours de l'érythropoïèse. Il était donc surprenant de ne pas retrouver d'anémie chez les souris malades, porteuses d'une invalidation homozygote de Tifl γ au niveau hématopoïétique. Nos résultats ainsi que ceux d'autres équipes, retrouvent une probable hématopoïèse extra-médullaire, de siège splénique, aboutissant au développement d'une splénomégalie. Ce mécanisme compensatoire se traduit dans notre modèle par la présence d'érythroblastes au sein de la rate.

Celle-ci, siège de l'hématopoïèse au cours de l'embryogenèse, perd rapidement ce rôle au profit du foie puis de la moelle osseuse qui représente le site actif du bon déroulement de ce processus. Par la suite, le rôle de la rate évolue, devenant l'organe de régulation de la destruction des éléments figurés du sang, notamment les érythrocytes. La moelle osseuse répond à différents stress tels que l'hypoxie par l'expansion des progéniteurs érythroïdes. Lorsque cette réponse est insuffisante ou que l'érythropoïèse médullaire normale faillit, la rate peut prendre le relai et développer une érythropoïèse de stress afin de limiter l'anémie. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour l'expliquer. L'un d'eux implique la diminution de l'apoptose précoce des érythroblastes (Socolovsky 2007), un autre consiste en l'augmentation des progéniteurs érythroïdes spléniques de stress appelés BFU-E, *via* l'activation de la voie de signalisation BMP4 (*bone morphogenic protein 4*)/Smad5 (Perry et al. 2007; Porayette and Paulson 2008; Perry et al. 2009). Les BFU-E de stress sont des progéniteurs spléniques érythroïdes immatures capables de former des colonies lorsqu'ils sont mis en culture dans un milieu composé de méthylcellulose durant cinq jours en présence d'EPO (érythropoïétine). Leur niveau d'expression à l'état basal est faible, en dehors de toute situation de stress. Une érythropoïèse de stress efficace est cruciale en situation d'hypoxie, mais son activation inappropriée est associée à un risque accru de transformation leucémique (Subramanian et al. 2008). L'équipe de Françoise Porteu a mis en évidence le rôle de la voie MAPK/ERK (*mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase*) comme régulateur négatif de l'érythropoïèse splénique à l'état basal, en montrant que l'inhibition spécifique de ERK1 la développe en induisant la réponse BMP4 (Guihard et al. 2010).

Nous avons auparavant mis en évidence un signe indirect d'érythropoïèse splénique dans notre modèle en montrant que la population CD71⁺Ter119⁺ splénique est plus importante que dans les souris contrôles (Aucagne et al. 2011). Confirmer l'existence de cette érythropoïèse de stress splénique sous-entendue par la présence d'érythroblastes spléniques identifiés par

des analyses en histologie et en cytométrie de flux, permettrait d'expliquer l'absence d'anémie chez les souris malades. Nous pourrions mettre en évidence des signes directs et indirects d'érythropoïèse de stress. Parmi les signes directs, les souris malades développeraient *in vitro* un plus grand nombre de colonies érythroïdes suite à la mise en culture d'érythrocytes spléniques en présence d'EPO. Parmi les signes indirects, les souris malades présenteraient par exemple :

- un niveau d'expression de Smad5 phosphorylé plus élevé dans les érythrocytes spléniques,
- une diminution du taux d'expression de ERK1 au niveau splénique.

Cependant, l'absence d'anémie ne signifie pas que la différenciation érythroïde soit normale. Celle-ci est pathologique dans notre modèle puisqu'il existe un blocage de la différenciation érythroïde au niveau médullaire. En effet, les populations érythroïdes immatures CD71⁺Ter119⁺ de la moelle osseuse sont plus importantes chez les souris malades comparées aux souris contrôles (Aucagne et al. 2011). De plus, notre équipe a récemment montré que les progéniteurs érythroïdes médullaires (progéniteur érythromégacaryocytaire, basoE, proE, chromaE, orthoE) diminuent chez la souris *Tif1γ*^{ΔΔ} âgée de quatre mois dans les mêmes proportions que les souris contrôles cinq fois plus âgées (Quere et al. 2014).

II. La perte d'expression de *Tif1γ* induit un SMP/SMD proche de la LMMC

A. Quelle en est la physiopathologie ?

Comme abordé précédemment, la physiopathologie de la LMMC est liée à l'existence d'une dominance clonale. De nombreuses mutations géniques vont ainsi être à l'origine du caractère prolifératif de la LMMC alors que d'autres mutations interviendront dans son caractère dysplasique.

Dans notre modèle, nous n'avons pas mis en évidence de déficits d'expression des gènes intervenant au cours de la physiopathologie de la LMMC humaine. Il semblerait donc que la délétion de *Tif1γ* soit à elle seule à l'origine de cette dominance clonale. Cela est sous-entendu par les évolutions moléculaire et phénotypique de notre modèle. En effet, nous avons montré que l'expression de *Tif1γ* diminue au fur et à mesure du temps (Quere et al. 2014). Même si le vieillissement physiologique des souris peut l'expliquer, une sélection clonale est

également très probable. Cela expliquerait l'expansion des GMP chez la souris *Tiflγ^{Δ/Δ}* : la diminution d'expression du gène est susceptible de biaiser la différenciation du progéniteur myéloïde commun vers les cellules granulocytaires et monocytaires, entraînant une prolifération granulomonocytaire. Néanmoins, l'augmentation du nombre de monocytes pourrait également s'expliquer par l'existence d'un blocage de leur différenciation en macrophages, d'où le déficit de ces derniers. A ma connaissance, l'expression de *TIF1γ* n'a jamais été étudiée au cours du vieillissement humain.

B. Quel type de population monocyttaire se développe ?

Si la population monocyttaire a été caractérisée au cours de la LMMC humaine comme étant la population dite classique CD14⁺CD16⁻, cela est moins aisé chez la Souris. En effet, la population murine « équivalente » exprime le CD115 et le Ly6C. Or, nous avons montré que l'expression du CD115 est très diminuée et celle du Ly6C est également présente à la surface des MDSC. Ainsi, nous ne sommes pas parvenus à préciser le phénotype des monocytes des souris *Tiflγ^{Δ/Δ}*.

1. La perte de *Tiflγ* est responsable d'une prolifération de cellules myéloïdes évoquant les MDSC de type granulocyttaire.

a. Histoire des MDSC

Les MDSC représentent une population myéloïde hétérogène dont l'origine reste controversée. Ces cellules pourraient en effet être issues soit de la différenciation de cellules myéloïdes immatures (iMC, *immature myeloid cells*) soit au contraire provenir de cellules granulocytaires matures (Rodriguez et al. 2009; Peranzoni et al. 2010) (Figure 16). Dans les conditions physiologiques, elles représentent une très faible proportion des cellules médullaires, sanguines et spléniques (Youn et al. 2008) et leur nombre augmente au cours du vieillissement à la fois chez la Souris (Enioutina et al. 2011) et chez l'Homme (Verschoor et al. 2013), pouvant expliquer le phénomène d'« immunosénescence » à l'origine de la plus grande susceptibilité aux cancers dans la population vieillissante. En conditions pathologiques, notamment au cours du cancer, ces cellules s'accumulent.

Les capacités des cellules néoplasiques à se propager ne sont pas seulement consécutives à l'inhibition de leur apoptose ou à leur passage systémique signant le développement de

métastases. Elles sont aussi le fruit de leurs possibilités d'échappement au système immunitaire. L'expansion des cellules MDSC, population cellulaire d'origine myéloïde, décrite dès le milieu des années 1960, représente un des mécanismes d'échappement de la cellule tumorale au système immunitaire. En effet, elles sont capables d'inhiber l'activité des lymphocytes T cytotoxiques chez des souris porteuses de tumeurs.

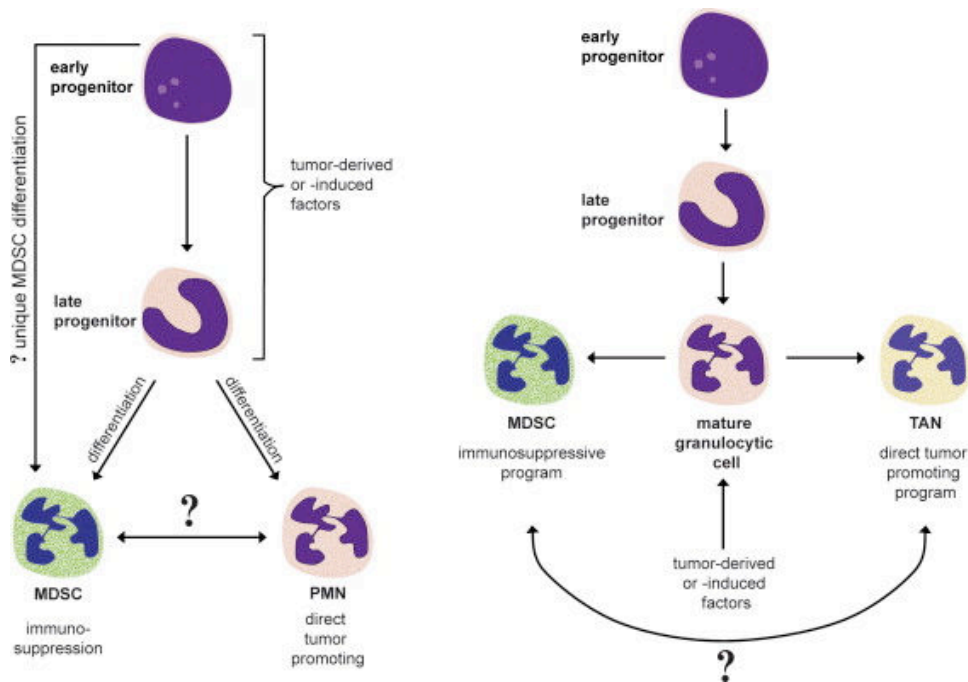


Figure 16 : Modèles hypothétiques de l'origine cellulaire des MDSC. A gauche, les MDSC sont issues d'un progéniteur immature. A droite, elles proviennent de la différenciation d'un granulocyte mature (adapté de Brandau S. *et al.*, Seminars in Cancer Biology, 2013).

b. Nomenclature des MDSC

Ces cellules, initialement appelées « cellules suppressives naturelles » ont été mises en évidence chez des souris porteuses de tumeurs développant une réaction « leucémoïde », c'est-à-dire composées de cellules myéloïdes (Lappat and Cawein 1964). La prolifération de ces cellules s'associait à une lymphopénie (Lee and Rosse 1982) et à une perte de fonction des lymphocytes T associée à la production de CSF (*colony-stimulating factor*) (Tsuchiya et al. 1988). L'absence d'expression des marqueurs phénotypiques lymphocytaires B, T, NK (*natural killer*) et macrophagique leur a valu le synonyme de « cellules non valides » (« *null cells* ») (Oseroff et al. 1984). Par la suite, plusieurs noms ont été donnés à ces cellules : cellules myéloïdes immatures, cellules myéloïdes suppressives (Bronte et al. 2001) ou cellules myéloïdes Gr1⁺ (Gabrilovich et al. 2001). En 2007, cette controverse sur la nomenclature de

ces cellules s'est achevée grâce à l'obtention d'un consensus. Le terme « MDSC » (*myeloid-derived suppressor cells*), cellule myéloïde suppressive, a été choisi pour caractériser ce type de cellule (Gabrilovich et al. 2007). Depuis lors, le concept de MDSC implique également le développement d'une myélopoïèse anormale au cours des processus cancéreux. Néanmoins, cette terminologie ne reflète pas le caractère immature de ces cellules myéloïdes.

c. Phénotype des MDSC

- Chez la Souris

Morphologiquement, ces cellules d'origine myéloïde ressemblent à des promyélocytes, témoignant de la précocité de leur différenciation, mais revêtent chez la Souris des caractéristiques à la fois granulocytaires et monocytaires (Peranzoni et al. 2010).

D'un point de vue immuno-phénotypique, ces cellules sont caractérisées chez la Souris et chez l'Homme par l'expression invariable du CD11b. Leur phénotype a longtemps été source d'incertitude et cela perdure, mais la co-expression de Gr1 (Ly6G/C) et CD11b a été proposée à la fin des années 1990 (Bronte et al. 1998). Depuis, leur caractérisation phénotypique s'est faite plus précise chez la Souris, contrairement à l'Homme. Ainsi, deux types de populations murines MDSC ont été décrites selon le niveau d'expression de Ly6C et Ly6G (Youn et al. 2008). Sont distinguées de cette manière les MDSC de type granulocyttaire, appelées PMN-MDSC (*polymorphonuclear-MDSC*), de phénotype $CD11b^+Ly6G^{high}Ly6C^{low}$ et les MDSC monocytaires, Mo-MDSC, de phénotype $CD11b^+Ly6G^{low}Ly6C^{high}$. La population MDSC granulocyttaire est prédominante chez les souris porteuses de tumeurs, comparée à la population monocyttaire (Youn et al. 2008). **Nos travaux identifient une population granulocyttaire immature immunophénotypiquement équivalente aux PMN-MDSC.**

D'autres marqueurs ont été décrits à la surface des MDSC. Ainsi, le CD31 a été mis en évidence par l'équipe de Vincenzo Bronte à la surface de cellules $CD11b^+Gr1^+$, capables d'immunosuppression sur les lymphocytes T $CD8^+$ (Bronte et al. 2000). Le F4/80 et le CMHII qui sont tous deux utilisés pour caractériser les macrophages associés aux tumeurs (TAM : *tumor-associated macrophages*), ont également été détaillés. Si ces derniers sont parfois confondus avec les MDSC, ils sont néanmoins définis morphologiquement par un aspect mature, bien différencié, contrairement aux MDSC (Movahedi et al. 2010). La confusion entre ces deux types cellulaires peut par ailleurs provenir de leurs marqueurs phénotypiques

puisque'ils possèdent en commun l'expression du récepteur α à l'IL-4 (CD124 ou IL-4R α) ainsi que le récepteur au CSF-1 (ou CD115 ou M-CSFR) (Gabrilovich and Nagaraj 2009). Néanmoins, contrairement aux TAM, les Mo-MDSC expriment plus faiblement le F4/80 mais plus fortement Gr1 (Gabrilovich and Nagaraj 2009). Une étude a par ailleurs proposé le CD49d comme marqueur phénotypique des Mo-MDSC (Haile et al. 2010). Le marqueur CD80 (Mencacci et al. 2002) a également été décrit à la surface des MDSC, témoignant de leur capacité immuno-suppressive. Enfin, l'expression intracellulaire de iNOS semble également distinguer les Mo-MDSC des PMN-MDSC. Les cellules iNOS⁺ (*inducible nitric oxide synthase*) n'expriment pas les marqueurs granulocytaires CXCR2 et Ly6G, retrouvés à l'inverse sur les cellules iNOS⁻ (Virtuoso et al. 2012). L'expression de iNOS est par conséquent caractéristique des MDSC monocytaires. Toutefois, l'expression intracellulaire de iNOS a été décrite dans des cellules porteuses d'un noyau en forme d'anneau, caractéristique des granulocytes immatures (Virtuoso et al. 2012). L'expression de iNOS dans les cellules sanguines et spléniques des souris malades *Tif1 $\gamma^{\Delta/\Delta}$* n'est pas différente de celle des souris contrôles, argument supplémentaire du caractère granulocyttaire des cellules myéloïdes présentes chez ces souris.

- Chez l'Homme

Chez l'Homme, l'expression phénotypique des MDSC est plus incertaine. A la fin des années 1990, les MDSC humaines ont été mises en évidence chez des patients présentant un cancer ORL sur la base de l'expression du marqueur CD34 et de leur capacité de lymphosuppression T (Pak et al. 1995). Dans cette étude, les cellules tumorales sécrètent du GM-CSF, sont porteuses du marqueur CD34 et sont capables d'inhiber la fonction lymphocytaire T étudiée *via* la sécrétion d'IL-2. Les autres caractéristiques phénotypiques des MDSC humaines sont l'absence d'expression de CD3, CD19, CD56, CD13 (Lin⁻), de la molécule HLA-DR (*human leukocyte antigen D-related*), la faible expression du CMH de classe II et la présence des marqueurs myéloïdes CD33 et CD11b (Almand et al. 2001). Plus récemment, l'étude plus rigoureuse du phénotype des MDSC humaines a permis de discriminer les PMN-MDSC exprimant CD15 des Mo-MDSC exprimant CD14, à partir de cellules tumorales respectives rénales (Rodriguez et al. 2009) et mélanomateuses (Poschke et al. 2010). D'autres marqueurs sont actuellement à l'étude afin de compléter la caractérisation phénotypique des MDSC humaines. Ainsi, les PMN-MDSC seraient également définies par la détection de CD66b, la faible expression de CD62L et de CD16 (Dumitru et al. 2012) et par l'expression du récepteur

1 au VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (VEGFR1) (Rodriguez et al. 2009). Les Mo-MDSC exprimeraient quant à elles S100A9 (Zhao et al. 2012). A ce jour, à notre connaissance, il n'a pas été rapporté l'éventuelle présence de populations de type MDSC chez les patients atteints d'une LMMC. Ceux-ci ne développant pas plus de cancers que la population générale, nous pourrions nous questionner sur l'existence réelle de cette population cellulaire au cours de cette hémopathie maligne. Cependant, rappelons que la médiane de survie d'une LMMC étant relativement courte, les patients décèdent vraisemblablement de leur LMMC avant de développer d'autres cancers. Il est en outre très probable que le caractère myéloprolifératif de la LMMC soit associé à une expansion plus importante des MDSC par rapport à celles dont les caractéristiques dysplasiques sont au premier plan. La difficulté réside dans leur caractérisation phénotypique, donc dans le choix des marqueurs. Il serait néanmoins intéressant de débiter cette étude par celle de l'expression sanguine du CD11b, CD14 et CD15 chez les patients. Si l'analyse est satisfaisante et permet de distinguer deux types cellulaires comme dans le modèle murin, nous pourrions élargir cette caractérisation phénotypique par l'étude des marqueurs cités précédemment et voir si nous confirmons les résultats de la littérature. Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier la réalité clinique des MDSC chez les patients LMMC et plus spécifiquement chez ceux porteurs d'une diminution d'expression de *TIF1 γ* par rapport à ceux dont l'expression est normale. Si l'expansion des MDSC est liée à l'inexpression ou à la diminution d'expression de ce gène, l'examen de l'expression de *TIF1 γ* deviendra incontournable lors de la prise en charge de cette hémopathie maligne.

d. Biologie des MDSC

Le facteur de transcription STAT3 a un rôle important dans la biologie des MDSC (Ostrand-Rosenberg and Sinha 2009). Il intervient dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose des cellules tumorales et il est également impliqué dans l'activation des MDSC. En effet, STAT3 est activé dans ces cellules par différents facteurs de croissance tels que l'IL-6, le SCF (*stem cell factor*), les prostaglandines, le GM-CSF ou encore le CSF-1 et le VEGF (Ugel et al. 2009). L'ensemble de ces facteurs déclenche dans ces cellules des voies de signalisation faisant intervenir la protéine kinase JAK convergeant vers l'activation du facteur transcriptionnel STAT3.

IRF8 (*Interferon regulatory factor 8*) est aussi impliqué dans la biologie des MDSC. En effet, l'inactivation de ce gène est responsable chez la Souris de l'expansion de cellules myéloïdes

correspondant à des MDSC essentiellement granulocytaires, envahissant la rate, à l'origine d'une splénomégalie, et capables de supprimer la prolifération lymphocytaire T, faisant d'Irf8 un régulateur négatif des MSDC. Injectées avec des cellules tumorales AT-3 issues de carcinomes mammaires murins, elles sont responsables d'une croissance tumorale plus rapide que lorsque les cellules AT-3 sont injectées de façon isolée (Waight et al. 2013). Dans le cadre de nos travaux, il serait intéressant de réaliser la co-injection de cellules EL4 (cellules responsables de l'expansion de MDSC avec développement de thymome) (Youn et al. 2008) et Gr1⁺ spléniques *Tifly*^{ΔΔ} à des souris receveuses et voir si la croissance tumorale est accrue par rapport à celle des souris injectées avec les cellules EL4 seules. Nous avons récemment injecté par voie sous-cutanée des cellules EL4 à deux souris contrôles et deux souris *Tifly*^{ΔΔ}. Les tumeurs développées par ces dernières étaient plus volumineuses que chez les souris contrôles. **Nos résultats tendent à suggérer que *Tifly* soit un régulateur négatif du développement d'une population partageant les caractéristiques des PMN-MDSC et potentiellement immunosuppressive.**

2. Développement des MDSC

Si le phénotype des MDSC humaines reste partiellement incertain et fait encore débat, leur grande hétérogénéité est communément admise. Elles ne se développent pas seulement au cours des processus néoplasiques puisque ces cellules sont également identifiées dans d'autres contextes, notamment auto-immuns, infectieux (Marshall et al. 2001; Goni et al. 2002) ou encore traumatiques (Gabrilovich and Nagaraj 2009; Ostrand-Rosenberg and Sinha 2009). Nous n'aborderons néanmoins par la suite que le contexte néoplasique. L'expansion de ces cellules myéloïdes immatures provient de la sécrétion de facteurs de croissance solubles par les cellules tumorales. De nombreux facteurs sont potentiellement responsables de cet effet, parmi lesquels le GM-CSF (Bronte et al. 1999), le G-CSF (Waight et al. 2011), le CSF-1 (Kusmartsev et al. 2003), l'IL-1β *via* l'IL-6 (Bunt et al. 2007), le VEGF (Gabrilovich et al. 1998; Melani et al. 2003), le SCF (Pan et al. 2008) et le FLT3L (Solheim et al. 2007). Tous stimulent la prolifération myéloïde et par voie de conséquence celle des MDSC qui s'accumulent dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires dont la rate. Ces cellules vont permettre aux cellules cancéreuses d'échapper à la réaction immune anti-tumorale. Ce mécanisme a été décrit dans de nombreux cancers dont les cancers ORL où une sécrétion de GM-CSF est présente de même que des cellules CD34⁺ immunosuppressives (Pak et al. 1995). Il en est de même au cours du lymphome de Hodgkin (LH), hémopathie lymphoïde

maligne caractérisée par la prolifération de la cellule de Reed-Sternberg issue du lignage B. L'équipe de Francesco Di Raimondo a montré l'existence de MDSC chez ces patients et a établi une corrélation entre le taux circulant de celles exprimant le marqueur CD34 au diagnostic et le pronostic défavorable des patients en terme de survie sans progression. Un nombre de MDSC CD34⁺ dépassant $0,0045 \times 10^9/L$ a ainsi la même valeur pronostique que la persistance d'un hypermétabolisme observé en tomographie par émission de positons (TEP-scanner) après deux cycles de chimiothérapie (Romano et al. 2015). L'avantage de la valeur pronostique des MDSC réside dans sa disponibilité dès le diagnostic et pourrait permettre d'adapter le traitement dès la première cure. Des MDSC se développent également au cours du myélome multiple (Gorgun et al. 2013) et sont responsables à la fois de la destruction osseuse en étant les précurseurs des ostéoclastes (Zhuang et al. 2012; Sawant and Ponnazhagan 2013) et du risque infectieux (Ramachandran et al. 2013) en inhibant les fonctions lymphocytaires T. Enfin, l'expansion des MDSC a en sus été décrite au cours de la leucémie myéloïde chronique (LMC) (Christiansson et al. 2013; Giallongo et al. 2015). Cette hémopathie maligne de la cellule souche hématopoïétique est caractérisée par l'acquisition d'une translocation équilibrée entre les chromosomes 9 et 22, aboutissant à un transcrite de fusion *BCR/ABL* et à la dérégulation de l'activité tyrosine kinase de la protéine de fusion résultante ainsi responsable de la leucémogénèse. Les patients porteurs d'une LMC dont le score de Sokal est élevé (défini selon des paramètres biologiques : taux d'éosinophiles, de basophiles, de plaquettes, de blastes et des paramètres cliniques : âge, taille de la rate) présentent une expansion de MDSC de type granulocytaire, *a contrario* absente chez les patients dont le score de Sokal est bas (Christiansson et al. 2013). L'équipe de recherche de Piera La Cava a montré que cette expansion de MDSC décroît après traitement avec un inhibiteur de tyrosine kinase tel que l'imatinib mésylate (Giallongo et al. 2015).

A l'instar de l'hétérogénéité des cancers (Fidler 1978), il existe une variabilité dans le développement de ces cellules myéloïdes qui pourrait être liée à une sécrétion de chimiokines et de cytokines différentes d'une néoplasie à l'autre (Talmadge and Gabrilovich 2013). L'équipe de François Ghiringhelli a par ailleurs décrit une autre voie pour l'activation des MDSC au cours des cancers : celle des exosomes. Les exosomes sont des complexes protéiques sécrétés par les cellules tumorales. Cette équipe a démontré l'existence d'une interaction entre la protéine de choc thermique Hsp72 aussi appelée Hsp70 (*Heat shock protein*) et le récepteur TLR2 à la surface des MDSC. Cette liaison déclenche la sécrétion d'IL-6 *via* MyD88, responsable de l'activation de STAT3. Il existe donc une boucle autocrine

dépendante de STAT3 et de l'IL-6 sur laquelle reposent les effets immunosuppresseurs des MDSC (Chalmin et al. 2010). **Dans notre modèle, l'expression de *Stat3* est supérieure dans les cellules Ly6G^{high}Ly6C^{low} sanguines chez les souris *Tif1γ^{Δ/Δ}*. L'absence de fonction immunosuppressive *in vitro* de ces cellules *Tif1γ^{Δ/Δ}* pourrait en partie s'expliquer par des anomalies dans l'activation de la protéine Stat3, *via* sa phosphorylation que nous n'avons pas étudiée.**

Par ailleurs, de nombreux modèles murins (Donkor et al. 2009; Younos et al. 2012) ont prouvé l'existence d'un lien entre la masse tumorale et le nombre de MDSC, étayé par diverses études cliniques (Porembka et al. 2012; Wang et al. 2013). Afin de corroborer ces données, des expériences de résection tumorale ont démontré que la réduction de la masse tumorale se traduisait par une baisse de nombre de MDSC circulantes d'une part et une augmentation de la population lymphocytaire T d'autre part (Salvadori et al. 2000; Rashid et al. 2013). Dans notre modèle, et il en serait probablement de même chez l'Homme, il est difficile d'établir ce lien puisque les MDSC correspondent en quelque sorte à la masse tumorale elle-même. **Néanmoins, à l'aune de ces travaux, il serait intéressant d'étudier l'évolution de la population cellulaire myéloïde suppressive des patients atteints de LMMC après qu'une thérapeutique avec un agent hypométhylant eut été initiée.**

3. Régulation des MDSC

Les MDSC sont contrôlées à plusieurs niveaux :

a. au niveau de leur synthèse

Comme indiqué précédemment, le nombre de MDSC dépend des facteurs sécrétés par la tumeur, agissant sur la survie et l'expansion des progéniteurs myéloïdes. Plusieurs auteurs ont ainsi rapporté que le G-CSF facilite la croissance tumorale en mobilisant les MDSC (Kowanetz et al. 2010; Waight et al. 2011). **Il serait intéressant d'injecter du G-CSF en sous-cutané aux jeunes souris *Tif1γ^{Δ/Δ}* afin d'évaluer si elles développent plus rapidement des MDSC.** Nous n'avons pas retrouvé de différences significatives en mesurant le taux plasmatique des facteurs de croissance intervenant dans la myélopoïèse (CSF-1, G-CSF) (Aucagne et al. 2011). Nous pouvons en conclure que **l'expansion des MDSC n'est pas liée à une dérégulation des facteurs de croissance myéloïde mais est probablement**

secondaire à une dérégulation des facteurs de transcription impliqués dans la myélopoïèse. A ce titre, nous avons montré que l'expression des gènes *Cebp/α*, *C/ebpβ*, *Egr2* et *Spi-1/Pu.1* est significativement diminuée dans les cellules médullaires myéloïdes *Tif1γ^{Δ/Δ}*. Néanmoins, la communauté scientifique continue de s'interroger sur l'existence d'un lien entre le type de facteur de croissance sécrété et le type histologique tumoral, de même que sur le mécanisme de régulation de la prolifération des MDSC par le facteur de croissance produit par la cellule tumorale.

b. au niveau de leur signalisation

Plusieurs voies de signalisation ont été décrites comme intervenant au cours de la prolifération des MDSC chez l'Homme et chez la Souris.

- **la voie RAS/MAP kinase**

C'est le cas de la voie RAS/MAP kinase (*Rat sarcoma/Mitogen-activated protein kinase*). Environ 20% des mutations décrites au cours des cancers concernent *RAS* (Bos et al. 1987). Ses mutations facilitent la prolifération tumorale à travers plusieurs mécanismes dont le recrutement de macrophages et de MDSC dans le microenvironnement tumoral *via* l'induction de cytokines telles que MCP-1 (*monocyte chemotactic protein*) et MIP-2 (*macrophage inflammatory protein-2*) (Clark et al. 2007).

- **La voie PI3K/AKT**

La voie PI3K/AKT (*Phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B*) est également impliquée dans la régulation des MDSC murines. En effet, cette voie de signalisation contrôle l'expression de facteurs de transcription impliqués dans la prolifération et la survie des MDSC. SHIP (*SH2 domain containing-5-inositol phosphatase*) et PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) sont des régulateurs négatifs de cette voie. Les souris *Ship^{-/-}* accumulent des monocytes, macrophages et MDSC du fait d'une prolifération accrue des progéniteurs myéloïdes (Helgason et al. 1998).

- La famille STAT

En sus, plusieurs membres de la famille STAT interviennent dans la signalisation des MDSC. STAT3, énoncé précédemment, agit en tant que modulateur de l'activité de l'arginase-1 pour le contrôle du rôle immunosuppresseur des MDSC (Vasquez-Dunddel et al. 2013) et promoteur de l'angiogenèse *via* l'augmentation du facteur de croissance proangiogénique VEGF (Kujawski et al. 2008). Inés Pineda-Torra et Benoit Pourcet ont récemment résumé la complexité de l'activation du promoteur d'*arginase-1* dans les macrophages murins. Son promoteur est régulé positivement par plusieurs gènes dont *Irf8*, *Spi-1/PU.1*, *Klf4*, *Stat3* et *C/ebpβ* (Pourcet and Pineda-Torra 2013) (Figure 17). Nous avons montré une diminution significative de l'expression de *Spi-1/PU.1*, *Klf4* et *C/ebpβ* au sein de la population médullaire myéloïde des souris *Tif1γ^{ΔΔ}*. Cela pourrait expliquer d'une part **l'absence d'expression d'*arginase-1* chez les souris *Tif1γ^{ΔΔ}* malgré une plus forte expression de *Stat3* et d'autre part le défaut de la fonction immunosuppressive directe des cellules myéloïdes de ces souris**. Néanmoins, il faut souligner que l'expression de *Stat3* n'a pas été étudiée dans le même type cellulaire que les autres gènes sus-cités. Certaines données de la littérature rapportent que STAT3 a également pour cible les gènes *S100A8* et *S100A9* (Sinha et al. 2008). Ainsi, nous avons montré une augmentation significative de l'expression de ceux-ci chez les souris *Tif1γ^{ΔΔ}*, à la fois au niveau sanguin et splénique. Toutefois, nous n'avons pas étudié le niveau d'expression des protéines.

Ces gènes sont régulés négativement au cours de la différenciation normale de progéniteurs myéloïdes en macrophages et cellules dendritiques (Cheng et al. 2008). L'hyperexpression de *S100A9* inhibe ainsi la différenciation des cellules dendritiques et des macrophages et promeut la différenciation des MDSC. **Il est possible que cela participe à l'altération de la différenciation des monocytes en macrophages observés à la fois *in vivo* et *in vitro* chez ces souris ainsi qu'aux défauts de différenciation en cellules dendritiques mis en évidence *in vitro***. Les protéines S100A8 et S100A9 forment un hétérodimère capable d'induire la formation du complexe NADPH oxydase à l'origine de la production de ROS dans les cellules myéloïdes, interférant avec la différenciation myéloïde (Cheng et al. 2008). De plus, l'équipe de Sheng Wei a rapporté l'expansion de MDSC Lin⁻HLA-DR⁻CD33⁺ dans la moelle osseuse de patients atteints de SMD, responsable de l'altération de leur hématopoïèse *via* un mécanisme impliquant S100A9 (Chen et al. 2013). Cette protéine représente en effet un ligand pour le CD33 induisant la sécrétion des cytokines IL-10 et TGF-

β par les MDSC. Ainsi, la signalisation du CD33 paraît être une cible thérapeutique intéressante chez ces patients. L'élaboration par cette même équipe d'un modèle murin transgénique pour *S100A9* permet l'étude de la pathogenèse des SMD.

STAT3 interagit aussi avec le facteur de transcription C/EBP β qui a un rôle central au cours du développement myéloïde, notamment lors de la « granulopoïèse de stress » déclenchée par exemple au cours d'événements infectieux. En effet, STAT3 contrôle, de façon dépendante du G-CSF, l'expression de C/EBP β (Zhang et al. 2010). Ainsi, un déficit en STAT3 rend les progéniteurs myéloïdes réfractaires à l'action du G-CSF. Par ailleurs, IRF8 est un facteur de transcription agissant en aval de STAT3 dans la régulation des MDSC. L'hyperexpression d'*Irf8* chez la Souris conduit à une baisse drastique du nombre de MDSC. A l'inverse, parallèlement à la diminution d'expression d'*IRF8*, le nombre de MDSC augmente chez les patients atteints de cancer du sein, faisant de ce facteur de transcription un modulateur négatif des MDSC (Waight et al. 2013). **De même, Tif1 γ apparaît comme un régulateur négatif du développement d'une population myéloïde immature phénotypiquement proche des PMN-MDSC puisque son inactivation se traduit par leur expansion. Nous pourrions compléter nos résultats en analysant l'évolution de cette population myéloïde après une stratégie de réexpression de Tif1 γ .** Enfin, STAT1 est impliqué dans l'activation de l'IFN γ et de l'IL-1 β . Les MDSC porteuses d'un déficit en STAT1 sont incapables d'inhiber les lymphocytes T du fait de leur inaptitude à réguler positivement iNOS et l'arginase-1. Un déficit en Stat1 dans les cellules myéloïdes *Tif1 γ ^{Δ/Δ}* explique-t-il une faible expression de *iNOS* et d'*arginase-1* ? Il serait intéressant de l'étudier. Stat6 est par ailleurs activée dans les MDSC lors de la liaison de l'IL-4 et de l'IL-13 au récepteur CD124 (IL4R α), résultant dans l'activation du TGF β et de l'arginase dans ces cellules (Bronte et al. 2003).

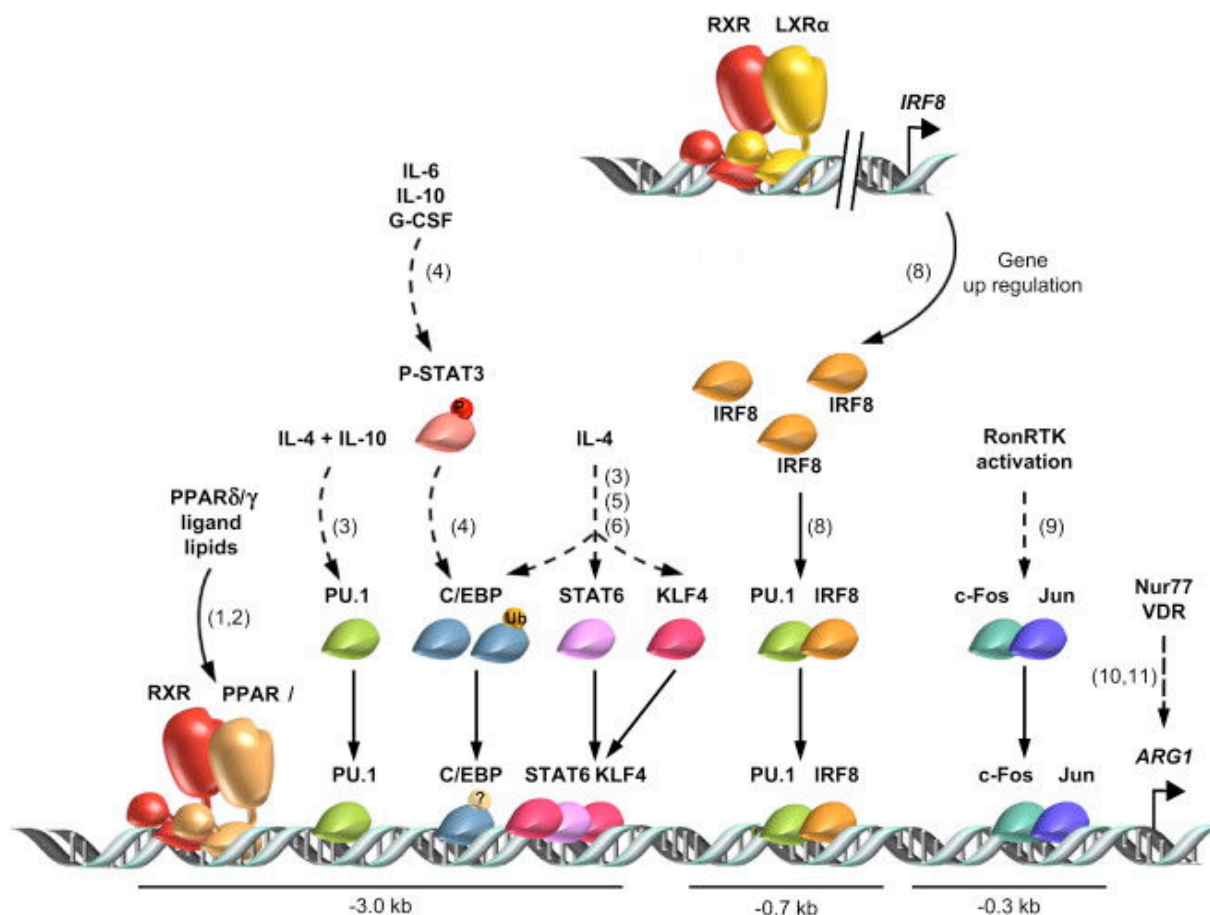


Figure 17 : Régulation du promoteur d'*arginase-1* (Pourcet and Pineda-Torra 2013)

- La voie du TGF β

Le TGF β agit en tant que régulateur positif ou négatif de la transcription en fonction du gène cible, du type cellulaire et du contexte. Les cellules immunitaires sont les principales sources de TGF β au cours des processus tumoraux. Une corrélation inverse entre le nombre de MDSC et l'activité cytotoxique des cellules NK a été mise en évidence chez des souris porteuses de tumeurs. L'expression de NKG2D (*natural-killer group 2, member D*) et le niveau d'IFN γ sont aussi significativement diminués lorsque les MDSC sont en contact avec des cellules NK. La fixation du TGF β 1 à la membrane des MDSC est nécessaire pour induire l'inhibition des cellules NK (Li et al. 2009). L'équipe de recherche de Harold Moses a également apporté des connaissances supplémentaires sur le rôle du TGF β dans la biologie des MDSC. La perte d'expression du TGF β RII dans des cellules cancéreuses murines accroît l'infiltration des MDSC, facilitant la prolifération tumorale et le développement métastatique. De plus, cette équipe a montré que les MDSC représentent une source de TGF β et de métalloprotéinases

facilitant l'envahissement tumoral (Yang et al. 2008). Par ailleurs, le TGF β peut agir sur les MDSC de façon indirecte *via* les microARN. En effet, le TGF β 1 contrôle la prolifération des MDSC en activant l'expression de miR-494. Son invalidation dans les MDSC aboutit à une décroissance tumorale et métastatique (Liu et al. 2012). Enfin, il existe un « dialogue » entre lymphocytes T régulateurs et MDSC mais qui reste incomplètement élucidé. Plusieurs études ont rapporté la capacité des MDSC à provoquer l'expansion ou la baisse du nombre de lymphocytes T régulateurs (Huang et al. 2006; Serafini et al. 2008; Centuori et al. 2012).

- Rôle de PGE2 (Prostaglandine E2) et COX-2 (Cyclooxygénase-2)

La prostaglandine PGE2 est une isoforme d'eicosanoïde possédant à la fois des propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives. Elle est synthétisée par l'enzyme COX-2 qui convertit l'acide arachidonique en prostaglandine H2 (PGH2) et la prostaglandine synthase isomérisé la PGH2 en PGE2. La signalisation de la PGE2 induit l'Arginase-1 dans les MDSC (Rodriguez et al. 2005; Zhang et al. 2009). L'inhibition des récepteurs de la COX-2 et de la PGE2 sur les MDSC supprime l'expression de CXCR4 et réduit leurs capacités de migration en réponse au SDF1 dans les cancers ovariens (Obermajer et al. 2011).

c. au niveau de leur différenciation

Les facteurs solubles sécrétés par les cellules tumorales, abordés dans le précédent paragraphe, participent aussi à l'inhibition de la maturation et de la différenciation des MDSC, contribuant à leur accumulation (Sica and Bronte 2007). En effet, ils empêchent leur différenciation en cellules dendritiques *via* un mécanisme impliquant la voie de signalisation de STAT3 (Gabrilovich 2004). Les prostaglandines (PGE2), le LPS, l'IL-1 β et l'IFN- γ , en induisant l'expression de la COX-2 dans les monocytes, inhibent leur différenciation en cellules dendritiques matures, les détournant vers un phénotype caractéristique des MDSC (Sinha et al. 2007b). Une équipe de recherche a mis en évidence l'existence d'une évolution inverse du nombre de cellules NK et de MDSC chez des souris porteuses de tumeurs (adénocarcinome colique, lymphome, cancer pulmonaire). En effet, sous l'effet du GM-CSF, les cellules NK CD27⁺CD11b⁺ sont « converties » en cellules CD11b⁺Gr1⁺, évoquant des MDSC (Park et al. 2013).

Si le GM-CSF participe au développement des MDSC dans un contexte néoplasique, il peut à l'inverse, associé à l'IL-4 ou le TNF α , induire leur différenciation en cellules présentatrices d'antigène telles que les cellules dendritiques ou les macrophages (Bronte et al. 1999; Bronte et al. 2000).

Les MDSC sont par ailleurs régulées par la vitamine D3 (Lathers et al. 2001) et l'acide tout-*trans* rétinoïque (Kusmartsev et al. 2003), tous deux capables de réduire le nombre et/ou la fonction des MDSC en induisant leur différenciation.

d. au niveau de leur mobilisation

Il est à ce jour admis que la CSH est maintenue au sein de son environnement médullaire correspondant à la niche hématopoïétique grâce à l'axe CXCL12 (SDF1)/CXCR4. Plusieurs molécules peuvent rompre cet axe et mobiliser les CSH dans la circulation. C'est sur ce principe que se sont développées les thérapeutiques mobilisatrices de CSH comme le G-CSF et/ou les antagonistes du récepteur CXCR4. Ces méthodes ne mobilisent pas seulement les CSH mais aussi les MDSC et les progéniteurs myéloïdes (Sawanobori et al. 2008).

4. Fonctionnalité des MDSC : cellules immunosuppressives (Figure 18)

Une corrélation inverse a été identifiée entre le nombre de MDSC et celui des lymphocytes T circulants, conférant à ces cellules des capacités immunosuppressives (Donkor et al. 2009). Les MDSC inhibent l'activation et la prolifération des LT.

a. de façon directe par :

- **La séquestration de plusieurs acides aminés** que les LT ne peuvent produire eux-mêmes tels que :
 - o l'arginine, en exprimant l'Arginase-1. Cette enzyme entraîne l'inhibition de la prolifération des LT *via* la nitrosylation du TCR (*T Cell Receptor*) au niveau du CD3 ζ (Rodriguez et al. 2007; Nagaraj et al. 2010a), l'expansion des LT régulateurs (Serafini et al. 2006; Serafini et al. 2008). Ce mécanisme d'action est particulièrement décrit pour la population PMN-MDSC.

- la cystéine, en entrant en compétition avec les cellules dendritiques pour son importation depuis le milieu extra-cellulaire. La prolifération des LT en est diminuée du fait d'une baisse de production en glutathion (Srivastava et al. 2010).
- **La production d'espèces réactives de l'oxygène** grâce aux enzymes eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) et NOX2 (*NADPH oxidase 2*) (Tacke and Kurts 2011).
- **La production de NO (oxyde nitrique) et des peroxy-nitrites** grâce à l'enzyme iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) entraînant l'apoptose des LT (Brito et al. 1999) et l'inhibition de leur prolifération, impliquant l'inhibition de JAK3 et STAT5. Cela semble plus particulièrement décrit pour les Mo-MDSC.
- **La modification de la réactivité du TCR**, limitant ainsi les capacités des LT à répondre à l'antigène, *via* la nitration du TCR au niveau du CD3 ζ (Nagaraj et al. 2010a).
- **La production de CO** (monoxyde de carbone) grâce à l'expression de l'enzyme HO-1 (*heme oxygenase 1*) (De Wilde et al. 2009).

b. de façon indirecte par :

- **La production de cytokines** telles que :
 - l'IL-10 et le TGF β (*transforming growth factor*) responsables de :
 - **l'induction des lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺** ayant une fonction suppressive sur les lymphocytes T (Huang et al. 2006), mais ceci reste à débattre comme mentionné précédemment,
 - **la polarisation des macrophages vers le type M2** sécrétant plus d'IL-10 et moins d'IL-12 (Sinha et al. 2007a),
- l'IL-6, l'IL-23 et le TGF β responsables de :
- **l'induction des lymphocytes Th17** (Jiao et al. 2012; Manjili et al. 2014),
- **la diminution de l'activité cytotoxique des LT** (Terabe et al. 2003).
- **L'inhibition de la migration des LT au niveau des sites inflammatoires et des organes lymphoïdes où ils doivent être théoriquement activés.** Ceci est possible grâce à l'expression par les

MDSC de la métallopeptidase ADAM17 qui induit le clivage de la L-sélectine CD62L à la surface des LT, impliquée dans leur migration (Hanson et al. 2009).

c. Elles favorisent également la croissance tumorale indépendamment de leur activité immunosuppressive par :

- **La promotion de la vascularisation tumorale** *via* la sécrétion de VEGF (Ostrand-Rosenberg and Sinha 2009), MCP-1 (Boelte et al. 2011) et MMP-9 (matrix métallopeptidase 9). Ainsi, les souris porteuses d'un déficit de l'inhibiteur de MMP-9 appelé TIMP-2 ont une croissance tumorale plus importante liée à une majoration de l'angiogenèse (Guedez et al. 2012).
- **Le développement de métastases** (Qu et al. 2012) en induisant la transition épithélio-mésenchymateuse (Toh et al. 2011) grâce aux protéines S100 (Ichikawa et al. 2011) d'une part et à la production de TGFβ d'autre part (Yang et al. 2008).
- **L'inhibition de l'activité des NK** en se liant au TGFβ1, entraînant la diminution de l'expression de NKG2D par les cellules NK (Li et al. 2009).

L'inhibition de l'immunité anti-tumorale à travers la lymphosuppression T et la facilitation de la progression tumorale *via* l'angiogenèse et le développement de métastases sont-elles des fonctions mutuellement exclusives ou les MDSC sont-elles capables d'une plurifonctionnalité ?

Nos résultats de co-cultures des lymphocytes T activés avec les cellules myéloïdes spléniques triées sur le Ly6G, considérées comme étant des PMN-MDSC, ne sont pas en faveur d'une lymphosuppression T chez les souris *Tif1γ^{Δ/Δ}*. Comme mentionné précédemment, l'absence de l'augmentation d'expression de l'arginase-1 pourrait constituer une explication. Il est donc possible que la population MDSC de ces souris n'ait pas de capacités immunosuppressives « directes » à proprement parler mais des **capacités « indirectes » *via* la production de cytokines**, comme nous l'avons montré pour la production de TGFβ, des capacités **de promotion tumorale *via* les protéines S100** et enfin des **propriétés proangiogéniques *via* le MCP-1/CCL2** dont la concentration plasmatique est significativement augmentée chez les souris *Tif1γ^{Δ/Δ}*. A ce titre, une équipe de recherche

lilloise a récemment rapporté l'augmentation de la concentration de MCP-1/CCL2 dans le thymus de souris atteintes de leucémie aiguë myéloblastique (Driss et al. 2015). L'administration d'anticorps anti-CCL2 entraîne une diminution de la masse tumorale liée à une majoration de la réponse immune anti-leucémique, permettant une amélioration de la survie des souris traitées. Aucun lien n'a été mis en évidence entre les taux de MCP-1/CCL2 et l'existence d'une population de type MDSC. Néanmoins, MCP-1/CCL2 constitue dans ce contexte une cible thérapeutique de choix.

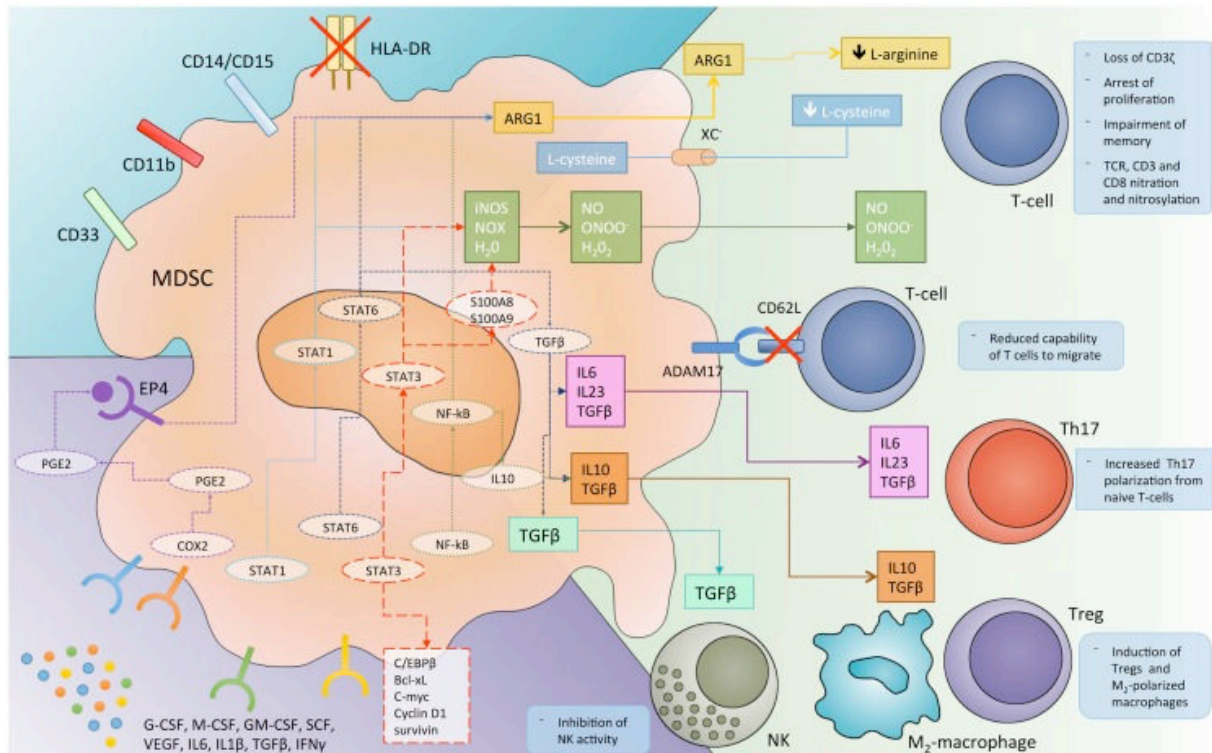


Figure 18 : Les MDSC inhibent la réponse immunitaire anti-tumorale.

Les MDSC séquestrent des acides aminés essentiels aux LT (arginine et cystéine) entraînant la diminution de leur prolifération (A). Elles sécrètent du NO, inhibent la migration de LT *via* le clivage de CD62L par la métallopeptidase ADAM17 (B), sécrètent des cytokines qui induisent les LT Th17 (IL-6, IL-23, TGFβ) (C) ainsi que les Treg (IL-10, TGFβ) (D), la polarisation des macrophages M2 (IL-10, TGFβ) (D) et inhibent les cellules NK (TGFβ) (E). (Adapté de Botta C. *et al.*, Front. Oncol., 2014)

5. Rôle des MDSC au cours de la grossesse

La grossesse est un état physiologique durant lequel le système immunitaire de la femme enceinte développe une tolérance afin d'empêcher le rejet du fœtus. En effet, la moitié du patrimoine génétique du fœtus provient du père si bien qu'il pourrait être considéré comme une « greffe semi-allogénique » pour la mère (Erlebacher 2013). Le fœtus pourrait ainsi devenir une cible pour son système immunitaire. Toutefois, la tolérance observée tient à une

immunosuppression importante développée en cours de grossesse grâce aux lymphocytes T régulateurs, à la baisse de l'expression des molécules du CMH de classe I situées à la surface des cellules fœtales et à celle des lymphocytes NK (Sargent et al. 2006). Le rôle des MDSC au cours de la grossesse est pour l'instant assez obscur mais il s'avère que ces cellules pourraient participer à cet état d'immunotolérance, pouvant expliquer que les tumeurs développées chez la femme enceinte soient le plus souvent métastatiques. Chez des souris gestantes atteintes d'un mélanome, l'équipe d'Ivan Stamenkovic a mis en évidence la présence de MDSC capables de diminuer la cytotoxicité des cellules NK, augmentant significativement le nombre de métastases. Ainsi, en majorant la tolérance du système immunitaire de la souris gestante afin d'empêcher le rejet du fœtus, les MDSC favorisent le développement de métastases (Mauti et al. 2011). Preuve supplémentaire de l'expansion des MDSC au cours de la grossesse, leur présence dans le sang de cordon. En effet, des cellules dont la morphologie évoque celle de granulocytes à divers stades de maturation, dont le phénotype est caractérisé par la présence de CD15 et l'absence de CD14, ont été retrouvées dans le sang de cordon en proportion superposable à celle du sang de patients atteints de cancers (5%) (Rieber et al. 2013). Dans le but de faire perdurer notre modèle, nous avons à plusieurs reprises tenté des croisements entre mâles et femelles homozygotes pour l'inactivation génique de *Tif1γ*. Il s'avère que l'ensemble des souris homozygotes femelles gestantes mourraient prématurément, si bien que les croisements ont dû être réalisés entre des souris hétérozygotes. Nous n'avons malheureusement pas cherché à expliquer ces décès. **Cette surmortalité peut-elle être liée à la présence de la population que nous avons identifiée ?** Les femelles sont-elles décédées d'infection ? Il serait par la suite intéressant, si le nombre de souris le permet, d'essayer de nouveaux croisements entre souris homozygotes et d'étudier les populations circulantes des souris gestantes homozygotes en les comparant à celles de même âge mais hétérozygotes.

6. Rôle des MDSC au cours des transplantations d'organes et des greffes allogéniques de moelle osseuse

Dans ces circonstances, la place des MDSC n'a jusqu'ici pas été aussi bien définie que les LT régulateurs. Néanmoins, plusieurs modèles murins ont permis de souligner le rôle tenu par les MDSC au cours des greffes d'organes dont :

- **La moelle osseuse** : l'inositol polyphosphate-5-phosphatase (SHIP) est impliquée dans la régulation des survie, prolifération et différenciation des cellules myéloïdes ainsi que dans le contrôle de l'homéostasie des MDSC (Liu et al. 1999). La SHIP a un rôle au cours de l'allogreffe de moelle osseuse puisque les souris porteuses d'un déficit en SHIP (*SHIP^{-/-}*) sont capables de recevoir une greffe allogénique de moelle osseuse sans développer de maladie du greffon contre l'hôte (MGH). Cela résulte de l'expansion de MDSC de type monocytaire qui suppriment la réponse allogénique T (Paraiso et al. 2007). Ce blocage de la réponse allogénique T responsable de l'inhibition de la MGH au cours de la greffe allogénique de moelle osseuse est également liée à l'Arginase-1 (Highfill et al. 2010) et à l'hème oxygénase-1 (De Wilde et al. 2009).
- **Le rein** : le rôle de iNOS est très important puisque l'administration d'inhibiteurs de iNOS induit le rejet du greffon rénal (Dugast et al. 2008).
- **La peau** : dans un modèle de greffe cutanée murine, l'induction de MDSC et de lymphocytes T régulateurs *in vivo*, respectivement par le facteur de croissance granulocytaire recombinant humain Filgrastim et les complexes IL-2, prolonge la survie du greffon (Adeegbe et al. 2011), suggérant d'une part le rôle des MDSC et d'autre part l'existence possible d'une coopération entre MDSC et Treg.
- **Le cœur** : des MDSC de type monocytaire ont été identifiées dans un modèle murin de greffe cardiaque. Elles migrent de la MO jusqu'au greffon où elles induisent l'expansion des LT régulateurs (Garcia et al. 2010).

Chez l'Homme, après transplantation rénale se développent des cellules myéloïdes CD14⁻ et CD14⁺ pouvant correspondre à des MDSC (Hock et al. 2012).

7. Choix de la thérapeutique ciblée contre les MDSC

Ces connaissances concernant la régulation des MDSC ont par la suite permis d'initier le développement de thérapeutiques ciblées afin d'en réduire le nombre et de rétablir l'immunité antitumorale.

a. Inhibition de la myéloprolifération

Certaines thérapeutiques peuvent réduire la croissance tumorale en **freinant la myéloprolifération** induite initialement par la tumeur. Cela a été observé lors d'une étude

menée avec des souris porteuses de carcinomes pulmonaires métastatiques chez qui l'utilisation du TNF α ou de l'IFN γ permet une réduction tumorale (Young and Wright 1992).

b. Induction de la différenciation des MDSC

Certains agents peuvent également **provoquer la différenciation des MDSC en monocytes matures ou en granulocytes**. C'est le cas de l'acide tout-trans rétinoïque (ATRA) utilisé *in vivo* chez la Souris (Kusmartsev et al. 2003) et *in vitro* chez des patients atteints de carcinome rénal à cellules claires (Kusmartsev et al. 2008). Cette étude réalisée à partir de cellules sanguines circulantes de patients, triées de façon magnétique sur l'antigène CD33 mis en contact avec l'ATRA, a démontré que celui-ci conduit à la différenciation des MDSC en cellules présentatrices d'antigènes (CPA), rétablissant ainsi la fonction lymphocytaire T. De même, des patients atteints de carcinome bronchique à petites cellules recevant de l'ATRA ont vu le nombre de MDSC diminuer et leur différenciation reprogrammée vers la formation de CPA (Lee et al. 2012). La 1 α ,25-dihydroxyvitamine D3 (Vitamine D3) entraîne également la différenciation des MDSC ce qui en réduit le nombre. Cela a été testé chez des patients atteints de tumeur de la tête et du cou recevant 3 semaines de vitamine D3 avant l'excision tumorale. Ceux-ci avaient un nombre de lymphocytes T CD4⁺CD8⁺ significativement augmenté dans la pièce de tumorectomie et la médiane de rechute de la tumeur était de 620 jours *versus* 181 jours chez les patients n'ayant pas reçu ce traitement néo-adjuvant (Walsh et al. 2010). Les inhibiteurs de STAT3 ont aussi été décrits dans l'induction de la différenciation des MDSC en cellules dendritiques dans un modèle murin de cancer colique (Nefedova et al. 2005).

c. Diminution des exosomes

Des **chimiothérapies cytotoxiques** ont également fait la preuve de leur efficacité dans le but de réduire le nombre de MDSC. C'est le cas de la gemcitabine (Suzuki et al. 2005) et du 5-fluoro-uracile (Vincent et al. 2010) capables d'inhiber la production des exosomes par les cellules cancéreuses, diminuant ainsi les MDSC. D'autres thérapeutiques dont l'utilisation initiale n'est pas antitumorale sont capables d'amoindrir la production des exosomes par les cellules tumorales *in vitro* et *in vivo*. Il s'agit de l'**oméprazole** (inhibiteur de la pompe à protons H⁺/K⁺ des cellules gastriques pour le traitement des ulcères) et de l'**amiloride**

(antihypertenseur) testé chez des patients porteurs de cancer colique métastatique (Chalmin et al. 2010).

d. Inhibition des facteurs de croissance ou de leur récepteur

Se sont par ailleurs développés des **anticorps dirigés contre les facteurs de croissance ou leur récepteur**. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de facteur de croissance sous la forme d'anticorps dirigés contre ceux-ci entraîne une réduction de la taille de la tumeur et du nombre de MDSC (Young et al. 1991; Pekarek et al. 1995). Chez la Souris, des anti-GM-CSF et anti-G-CSF sont utilisés afin de traiter respectivement les néoplasies pancréatiques (Bayne et al. 2012) et coliques (Shojaei et al. 2009). L'équipe de recherche de Paolo Serafini a rapporté l'administration d'aptamères anti-IL-4R α chez des souris porteuses de tumeurs. Ils permettent la diminution du nombre de MDSC et conséquemment le rétablissement de la fonction lymphocytaire T ainsi que la réduction de la masse tumorale (Roth et al. 2012). Chez l'Homme, l'inhibition de leur prolifération est induite par l'anti-VEGF (VEGF-A) (bevacizumab) (Shojaei et al. 2007) ou par l'inhibiteur multi-cible de tyrosine kinase sunitinib (Ko et al. 2009) dans le cadre d'une prise en charge du carcinome rénal. Les cibles du sunitinib sont nombreuses parmi lesquelles les récepteurs du VEGF, de STAT3 (Xin et al. 2009) et du CSF-1 (Ravi et al. 2011). Il est responsable de la baisse de 50% des MDSC dans le sang circulant des patients atteints de carcinome rénal à cellules claires.

e. Inhibition du recrutement des MDSC

Les antagonistes de CXCR4 (Plérixafor) sont efficaces chez la Souris pour **empêcher le recrutement des MDSC sur le site tumoral** d'un modèle de cancer du sein (Yang et al. 2008).

f. Inhibition de la fonction immunosuppressive des MDSC

Abolir l'effet immunosuppresseur des MDSC est également une possibilité thérapeutique anticancéreuse. Ainsi, les inhibiteurs de la 5 phosphodiesterase (sildenafil, Viagra) utilisés dans les troubles érectiles régulent négativement l'arginase-1 ainsi que NOS2, inhibant la production de NO par les MDSC, diminuant ainsi leur action immunosuppressive (Noonan et al. 2014). La nitroaspirine (NO-aspirine) est composée d'acide acétylsalicylique lié de façon

covalente à un groupe donneur de NO interférant avec le métabolisme du NO. Administrée par voie orale à des souris porteuses de tumeurs, la NO-aspirine permet d'augmenter le nombre et la croissance des lymphocytes T cytotoxiques, de réduire la production de ROS et d'inhiber NOS2 (De Santo et al. 2005). La baisse de la production des ROS pour limiter l'immunosuppression liée aux MDSC a également été envisagée grâce au bardoxolone méthyl (CCDO-Me), un triterpénoïde synthétique (hydrocarbure naturel dérivé du triterpène). Cette molécule supprime la réaction inflammatoire qui résulte de l'action des ROS dans les macrophages (Thimmulappa et al. 2007) *via* l'activation du facteur de transcription Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor*) (Li et al. 2014a). Des études d'abord menées chez la Souris ont montré que l'administration de cette molécule permet de réduire l'activité suppressive des MDSC et restaurer la réponse immunitaire T (Wang et al. 2014). Chez l'Homme, son utilisation lors d'un essai clinique de phase I associée à la gemcitabine au cours de l'adénocarcinome pancréatique accroît la réponse T et freine l'expansion des MDSC (Nagaraj et al. 2010b). Enfin, les inhibiteurs de la cyclo-oxygénase 2 (Celecoxib) ou de la PGE2 (AINS) (anti-inflammatoire non stéroïdien) visent également à abaisser le nombre de MDSC (Veltman et al. 2010).

g. Inhibition des prolifération et mobilisation des MDSC

Des thérapeutiques capables de **réduire la prolifération et la mobilisation des MDSC** ont également été proposées. Les souris porteuses d'un cancer mammaire présentent un déficit d'expression du récepteur au TGF β de type II, entraînant une augmentation de l'infiltration tumorale par les MDSC et par voie de conséquence le développement de métastases. Cette infiltration tumorale est liée à des protéases dont MMP-9. Cette protéase influence positivement la prolifération et la mobilisation des MDSC de la moelle osseuse et peut être ciblée par les biphosphonates qui en inhibent la prénylation. A cette fin, l'acide zolédronique de la classe des biphosphonates a été utilisé chez des souris porteuses d'un cancer du sein. Le taux de cette protéase diminue sous l'effet du biphosphonate puis s'ensuivent une chute de l'expansion des MDSC dans la moelle osseuse et le sang ainsi qu'une décroissance tumorale (Melani et al. 2007). Une autre équipe de recherche a testé l'acide zolédronique chez des souris affectées par un cancer du pancréas et a montré la réduction du nombre de MDSC au sein de la tumeur, l'augmentation du recrutement des lymphocytes T sur le site tumoral, un ralentissement de la croissance tumorale et une médiane de survie allongée (Porembka et al. 2012).

- h. Quelles sont les perspectives thérapeutiques ciblées contre les MDSC au cours de la LMMC ?

Dans notre modèle de LMMC, nous pouvons considérer la population myéloïde que nous avons identifiée comme une cible thérapeutique potentielle. L'existence de cette population résultant de la baisse d'expression de *Tiflγ* et non des facteurs de croissance induits par les cellules tumorales, nous incite à envisager l'essai de thérapeutiques visant à limiter la myéloprolifération observée ou celles ayant pour but d'induire la différenciation de ces cellules immatures comme l'ATRA. A cette fin, nous pourrions tester *in vitro* voire *in vivo* l'effet de l'ATRA chez les souris malades *Tiflγ^{ΔΔ}*. Chez l'Homme, si une population de type MDSC est présente, leur caractérisation phénotypique pourrait également permettre de développer des anticorps monoclonaux dirigés contre des marqueurs phénotypiques dont le CD14 ou le CD15, comme cela est déjà le cas dans d'autres hémopathies malignes telles que les LAM (Mylotarg, anti-CD33), les lymphomes malins hodgkiniens (Brentuximab vedotin, anti-CD30) ou non hodgkiniens (Rituximab, anti-CD20). Il est même possible d'envisager une chimiothérapie combinatoire en associant la gemcitabine qui, comme nous l'avons vu précédemment, diminue la production des exosomes, avec un anticorps monoclonal. De même, les thérapeutiques visant à inhiber les fonctionnalités des MDSC pourraient être intéressantes. Ainsi, l'identification de MDSC au cours de la LMMC offrirait de belles perspectives thérapeutiques pour cette hémopathie maligne dont le pronostic reste sombre et les possibilités thérapeutiques limitées.

8. La diminution progressive de l'expression de *Tiflγ* s'accompagne d'une expansion accrue de « PMN-MDSC like »

Nous avons montré la diminution progressive de l'expression de *Tiflγ* avec le vieillissement des souris *Tiflγ^{ΔΔ}* (Quere et al. 2014). Cela s'accompagne d'une expansion progressivement croissante de la population myéloïde immature, visible sur les frottis sanguins ainsi que sur les signatures phénotypiques et moléculaires sanguines des souris *Tiflγ^{ΔΔ}*. En effet, avant l'âge de 6 mois, cette population myéloïde immature ne se développe pas. Elle est visible à partir de l'âge de 6 mois et devient majoritaire à partir de l'âge de 9 mois. Existe-t-il une corrélation inverse entre l'expression de *Tiflγ* et l'expansion de la population que nous avons

identifiée ? Existe-t-il de même une diminution de l'expression de *TIF1γ* au cours du vieillissement humain ?

9. Les granulocytes associés aux tumeurs : leur place par rapport aux MDSC

Cette population de granulocytes est capable, à l'image des MDSC, d'acquérir une activité immunosuppressive. Décrite notamment dans les glioblastomes, leur présence est associée à un niveau élevé d'arginase-1 dans le sérum et une expression diminuée de la chaîne ζ du TCR (Sippel et al. 2011). La figure 15 illustre l'hypothèse d'une origine commune aux PMN-MDSC et granulocytes associés aux tumeurs.

C. Quid de l'expansion des MDSC au cours des néoplasies durant lesquelles l'expression de *TIF1γ* est en deçà de son taux normal ?

Comme précédemment rapporté, la perte d'expression de *TIF1γ* chez l'Homme a été décrite au décours de nombreuses néoplasies solides telles que les cancers de la tête et du cou, les carcinomes rénaux à cellules claires, les cancers bronchiques non à petites cellules, les tumeurs pancréatiques *etc.* Il serait intéressant de savoir s'il existe une myéloprolifération aberrante au cours de ces cancers, responsable de l'expansion de MDSC. A ma connaissance, cet aspect n'a pas été abordé jusqu'ici.

III. La perte d'expression de *Tif1γ* entraîne une diminution du *csf-1r*

A. Impact sur la monocytopoïèse

L'expression du CSF-1R et de son transcrit est significativement diminuée chez la souris *Tif1γ^{ΔΔ}*, que ce soit dans les cellules myéloïdes médullaires immatures ou dans les cellules en cours de différenciation macrophagique sous l'effet du CSF-1 *in vitro*.

Toutefois, il n'existe pas de monocytopenie, bien au contraire, alors même que ce récepteur est impliqué dans la monocytopoïèse. Cela suggère qu'une autre voie de signalisation dépendant d'une autre cytokine et son récepteur interviendrait dans la monocytopoïèse des souris *Tif1γ^{ΔΔ}*. D'après certaines données de la littérature, il pourrait s'agir du VEGFα ou du GM-CSF. Nous n'avons pas retrouvé de différence significative dans l'expression du *gm-csfr*

à la fois dans la moelle osseuse totale et dans les cellules $Lin^- Tif1\gamma^{\Delta\Delta}$ comparées aux cellules contrôles. Son expression n'avait néanmoins pas été étudiée dans les différentes sous-populations cellulaires. Cependant, la cytokine gm-csf n'a pas pu être dosée en ELISA dans le sérum des souris malades comme cela avait été fait pour le csf-1 et le g-csf en raison de la sensibilité de la technique. Il serait en effet intéressant de savoir si celle-ci est augmentée.

B. Impact sur les macrophages

1. Impact quantitatif

A l'instar de ce que nous avons observé dans le péritoine, le nombre de macrophages est diminué à la fois *in vitro* et *in vivo* dans certains organes. Le marqueur F4/80 examiné au niveau médullaire, cutané, splénique et hépatique en immunohistochimie donne des résultats distincts puisque la population macrophagique semble plus importante dans le foie et la peau $Tif1\gamma^{\Delta\Delta}$ comparativement à la souris contrôle, à l'inverse de la rate et de la moelle osseuse. Néanmoins, ces résultats seront à compléter avec ceux de la cytométrie en flux afin de quantifier plus précisément ces différentes populations. Si les analyses immunohistochimiques sont confirmées, cela signifiera que la différenciation macrophagique est affectée différemment selon les organes, ou que d'autres cellules exprimant le F4/80 envahissent ces tissus. C'est par exemple le cas des MDSC monocytaires.

L'expression du *Csf-1r* est diminuée voire absente au cours de la différenciation macrophagique *in vitro*. Nous avons également montré en collaboration avec l'équipe d'Eric Solary une corrélation entre l'expression de *TIF1γ* et celle du *CSF-1R* chez les patients atteints de LMMC (Aucagne et al. 2011). Les expressions de *TIF1γ* et de *CSF-1R* sont parallèles. ***Tif1γ* est donc un gène d'importance pour l'ensemble de la myélopoïèse, jusqu'aux stades de différenciation terminale. Cette perte d'expression du *Csf-1r* nous a paru dans un premier temps expliquer les défauts de différenciation macrophagique. Toutefois, l'existence des mêmes altérations de différenciation des cellules dendritiques alors même que le taux de Gm-csfr n'est pas anormal chez les souris malades nous a finalement fait émettre l'hypothèse que l'augmentation d'expression de certains gènes de signature MDSC pourrait être à l'origine de ces anomalies de différenciation. Ainsi, il est possible que la baisse d'expression de *Tif1γ* qui perturbe**

intensément la myélopoïèse, favorise celle de gènes tels que *S100A8* et *S100A9*, avec pour conséquence l'expansion des « PMN-MDSC-like » au détriment de la production de certains types de macrophages et de cellules dendritiques.

L'origine des macrophages étant triple, leur diminution en nombre peut s'expliquer de trois manières. Du fait de l'absence de monocytopenie, si l'origine monocytaire doit être retenue, cela sous-entend une altération qualitative et non quantitative de la différenciation des monocytes en macrophages. Cela pourrait correspondre à un **blocage de la différenciation des monocytes ou à une apoptose accrue des cellules en cours de différenciation**. Nous avons étudié les marqueurs d'apoptose (Annexine V, 7-AAD, Caspase 3) en cours de différenciation macrophagique *in vitro* et n'avons pas montré de différence significative. Nous avons réalisé les mêmes expériences au cours de la différenciation des cellules myéloïdes médullaires en cellules dendritiques et avons au contraire mis en évidence un apoptose accrue des cellules *Tiflγ^{ΔΔ}* (Figure 20). L'auto-renouvellement des macrophages pourrait également expliquer la diminution de leur nombre et vu leur altération fonctionnelle décrite dans notre étude, cela semble tout à fait possible. Enfin, il est difficile d'estimer si les macrophages originaires du sac vitellin sont moindres. Une étude nettement plus fine des différentes populations macrophagiques tissulaires (cérébrales, hépatiques, spléniques, cutanées, rénales, pulmonaires) pourrait répondre à cette interrogation.

2. Impact qualitatif

Les fonctions des macrophages sont altérées *in vitro*. Cependant, ces résultats doivent être pondérés par le fait que, même si le nombre de cellules sur lesquelles sont effectuées ces expériences de fonctionnalité est identique, nous n'avons pas réalisé de tri cellulaire sur le marqueur F4/80 afin de ne sélectionner que les macrophages.

Par ailleurs, comme cela a été mentionné précédemment, une modification notable du taux de MCP-1/CCL2 est mesurée dans les souris *Tiflγ^{ΔΔ}*. En effet, nous avons démontré que la concentration plasmatique de MCP-1/CCL2 est significativement augmentée chez ces dernières alors qu'une fois stimulées par le LPS, les cellules *Tiflγ^{ΔΔ}* ne sécrètent quasiment plus de MCP-1/CCL2. Ce résultat pourrait constituer un argument en faveur de **l'absence de réponse des macrophages *Tiflγ^{ΔΔ}* au LPS**. Il serait ainsi intéressant d'étudier l'expression des TLR à la surface des macrophages.

3. Les souris *Tiflγ^{ΔΔ}* ne s'infectent pas davantage

Malgré l'expansion du nombre de MDSC et un déficit de nombre de macrophages, les souris *Tiflγ^{ΔΔ}* ne présentent pas un risque infectieux accentué. Cette observation semble étonnante même si elles sont élevées en milieu EOPS (exempt d'organismes pathogènes spécifiques). Néanmoins, ces anomalies ne se développent pas immédiatement et les souris malades sont généralement sacrifiées rapidement selon nos protocoles expérimentaux. Il est possible qu'un taux d'infection accru soit constaté si nous prolongions la survie d'une cohorte. Il paraît donc intéressant d'induire un processus infectieux chez les souris *Tiflγ^{ΔΔ}* afin de rechercher une éventuelle accélération de la mortalité résultant de l'infection.

IV. Conclusion

Tiflγ, gène suppresseur de tumeur impliqué dans la leucémie myélomonocytaire chronique, apparaît comme indispensable à une myélopoïèse normale. Son invalidation chez la Souris est responsable d'une prolifération myéloïde sanguine, médullaire et splénique dont les caractéristiques morphologiques, phénotypiques et moléculaires évoquent celles d'une population granulocytaire immature potentiellement immunosuppressive. L'expansion de cette population myéloïde semble se faire au détriment de la différenciation monocyttaire normale, se traduisant notamment par des différenciations macrophagique et dendritique altérées. Une hypothèse possible est que la diminution d'expression de *Tiflγ* induise l'expression de certains gènes dont celle de *S100A8* et *S100A9*, responsables de l'expansion de cette population au détriment des différenciations macrophagique et dendritique.

Ces conclusions ouvrent sur de nombreuses perspectives à la fois dans ce modèle murin et chez les patients atteints de LMMC. Il conviendra de comprendre l'absence de capacités immunosuppressives *in vitro* des cellules myéloïdes « PMN-MDSC-like » en étudiant le statut phosphorylé de Stat3 mais également d'approfondir l'analyse de la fonctionnalité de ces cellules myéloïdes (sécrétion de NO, de ROS). Il serait par ailleurs pertinent d'apporter des preuves indirectes de l'existence de MDSC dans ce modèle. Une des possibilités serait de montrer que la taille des tumeurs développées par des souris contrôles ayant été co-injectées de cellules Gr1⁺ spléniques d'une souris *Tiflγ^{ΔΔ}* malade et de cellules EL4 est supérieure à celle des tumeurs développées par des souris contrôles ayant reçu l'injection de cellules EL4 seules. L'administration de G-CSF à des souris contrôles et *Tiflγ^{ΔΔ}* pourrait conduire aux mêmes conclusions. Enfin, l'étude de l'existence de cette population chez les patients atteints

de LMMC paraît incontournable, par l'analyse immunophénotypique du CD14, CD15 et HLA-DR au sein des cellules myéloïdes CD11b⁺. Aller plus loin si ces résultats sont probants en suivant l'évolution de cette population sous agent hypométhylant semble également pertinent. A l'ère des thérapeutiques ciblées et « à la carte » en hématologie, l'identification d'une cible thérapeutique dans la LMMC semble s'approcher.

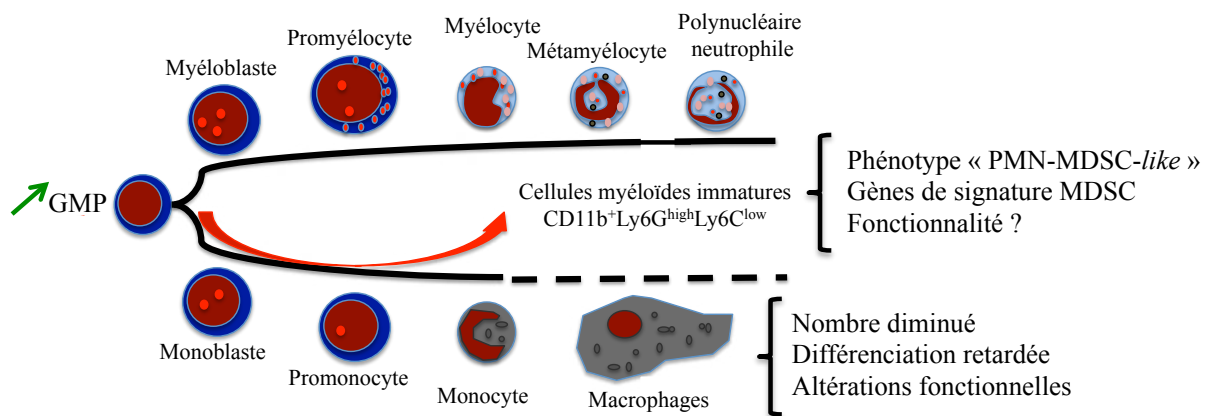


Figure 19 : Représentation schématique des conséquences de la perte d'expression de Tifl γ sur les différenciations granulocytaire et monocytaire. L'expansion des GMP se traduit par celle d'une population myéloïde de morphologie immature dont le phénotype et la signature moléculaire évoquent ceux des PMN-MDSC. Leur fonctionnalité immunosuppressive n'est cependant pas retrouvée. Parallèlement, la différenciation monocyto-macrophagique est altérée tant dans ses aspects quantitatif que qualitatif.

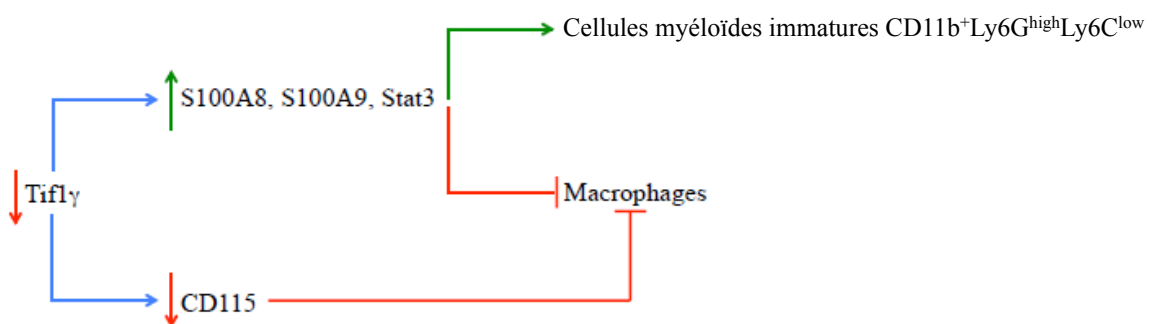


Figure 20 : Représentation schématique des conséquences de la perte d'expression de Tifl γ sur l'expression de différents gènes et leur implication dans les différenciations. La baisse d'expression de Tifl γ entraîne une diminution de celle du CD115 se traduisant par une altération de la différenciation des macrophages. Celle-ci peut également s'expliquer par l'augmentation du niveau de *S100A8* et *S100A9* dont l'hyperexpression détourne la différenciation normale des GMP vers des cellules myéloïdes immatures de type « PMN-MDSC-like » au détriment des différenciations des voies macrophagique et dendritique.

ANNEXES



Tif1 γ regulates the TGF- β 1 receptor and promotes physiological aging of hematopoietic stem cells

Ronan Quéré^{a,b,1}, Laetitia Saint-Paul^{a,b}, Virginie Carmignac^c, Romain Z. Martin^{a,b}, Marie-Lorraine Chrétien^{a,b,d}, Anne Largeot^{a,b}, Arlette Hammann^e, Jean-Paul Pais de Barros^f, Jean-Noël Bastie^{a,b,d}, and Laurent Delva^{a,b,1}

^aInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMR866, 21000 Dijon, France; ^bLabex LipSTIC and ^cEquipe Génétique des Anomalies du Développement, EA 4271, Université de Bourgogne, 21000 Dijon, France; ^dHôpital Universitaire, Service d'Hématologie Clinique, 21000 Dijon, France; and ^ePlateforme de cytométrie and ^fPlateforme de lipidomique, Université de Bourgogne, 21000 Dijon, France

Edited by Zhu Chen, State Key Laboratory of Medical Genomics, Shanghai Institute of Hematology, Rui Jin Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, China, and approved June 10, 2014 (received for review March 25, 2014)

The hematopoietic system declines with age. Myeloid-biased differentiation and increased incidence of myeloid malignancies feature aging of hematopoietic stem cells (HSCs), but the mechanisms involved remain uncertain. Here, we report that 4-mo-old mice deleted for transcription intermediary factor 1 γ (Tif1 γ) in HSCs developed an accelerated aging phenotype. To reinforce this result, we also show that Tif1 γ is down-regulated in HSCs during aging in 20-mo-old wild-type mice. We established that Tif1 γ controls TGF- β 1 receptor (Tgfr1) turnover. Compared with young HSCs, Tif1 γ ^{-/-} and old HSCs are more sensitive to TGF- β signaling. Importantly, we identified two populations of HSCs specifically discriminated by Tgfr1 expression level and provided evidence of the capture of myeloid-biased (Tgfr1^{hi}) and myeloid-lymphoid-balanced (Tgfr1^{lo}) HSCs. In conclusion, our data provide a new paradigm for Tif1 γ in regulating the balance between lymphoid- and myeloid-derived HSCs through TGF- β signaling, leading to HSC aging.

Trim33/Tif1 γ (tripartite motif family 33/transcription intermediary factor 1 gamma), a member of the transcriptional intermediary factor 1 family (1, 2), is a crucial regulator of transcription during hematopoiesis (3–5). We and others have previously demonstrated Tif1 γ involvement in myeloproliferative disease (6, 7). Mice deleted for this gene develop a substantial loss of lymphoid cells and a dramatic increase of myeloid cells (3, 6, 7). Loss of Tif1 γ favored expansion of the granulomonocytic progenitor compartment in bone marrow (BM), which led to this lineage skewing. Furthermore, Tif1 γ exerts its functions in a cell-autonomous manner, as revealed by competitive transplantation experiments. With aging, mice deleted for Tif1 γ develop a myeloproliferative disease involving the proliferation of immature precursors of myelocytes and monocytes (6, 7). Therefore, the disease recapitulates important features of human chronic myelomonocytic leukemia (6). In humans, the mean age at the onset of this disease, which is probably linked to the aging-related decreased fitness of hematopoietic stem cells (HSCs), is older than 70 y.

Changes in the biological functions of old HSCs have been directly linked to the development of several hematological disorders. The most clinically significant aspect of age-dependent hematopoietic dysfunction corresponds to the noticeable increased incidence of myeloproliferative diseases, leukemia, and other hematological diseases (8). Adult HSCs produce all blood lineages during lifetime, but their capacity to generate lymphoid cells declines with age, whereas myelopoiesis is enhanced (9–11). With age, HSCs in BM show an increased propensity to differentiate toward the myeloid rather than the lymphoid lineage, which may contribute to the decline in lymphopoiesis. HSC aging results from alterations of both cell-intrinsic and cell-extrinsic molecular mechanisms (12). It has become obvious that HSCs are particularly heterogeneous, given their differentiation capacities. Indeed, some HSCs harbor a low ability to differentiate into lymphoid cells and are considered myeloid-biased, whereas other HSCs exhibit the opposite properties. Finally, a third subset of HSCs appears to maintain a balanced production and is considered to comprise balanced HSCs (13, 14). Nevertheless, the

molecular mechanisms responsible for the aging-associated increase in HSC numbers and differentiation capacities are far from being understood.

Interestingly, Tif1 γ has also been implicated in TGF- β signaling through its binding to phosphorylated small mother against decapentaplegic (Smad)2/3 (4, 15) and to Smad4 to promote its ubiquitination (16–18). Moreover, TGF- β signaling pathways have long been known to be involved in modulating HSC quiescence (19, 20), partly by preventing HSC reentry into the cell cycle (21). Myeloid- and lymphoid-biased HSC populations seem to respond differently to TGF- β signaling (22). Therefore, the mechanisms by which age-related differences in HSCs are affected by TGF- β need to be characterized.

Deciphering how aging-associated changes within the hematopoietic system influence leukemia development will be crucial for the development of therapeutic strategies. As there are important similarities between the physiological aging of hematopoiesis and the HSC premature aging phenotype observed in young Tif1 γ ^{-/-} mice, here we used this newly established model to investigate the effect of Tif1 γ on hematopoietic aging at the physiological, cellular, and molecular levels.

Results

An Accelerated Aging-Like Phenotype Is Observed in Tif1 γ ^{-/-} Hematopoiesis. To determine whether Tif1 γ ^{-/-} mice developed a premature aging-like phenotype, we analyzed HSCs isolated from the BM of 4-mo-old Tif1 γ ^{-/-} mice and compared them with HSCs isolated from 20-mo-old (old) and 4-mo-old (young) wild-type (wt) mice. The number of long-term HSCs defined by signaling

Significance

Hematopoietic stem cell aging has been directly linked to the development of several hematological disorders, including myeloproliferative diseases. Here we show that in elderly mice (20 mo old), physiological aging of the hematopoietic system is linked to a decreased expression of transcription intermediary factor 1 γ (Tif1 γ) in HSCs. In turn, in young Tif1 γ ^{-/-} mice (4 mo old), the hematopoiesis aging phenotype is exacerbated. In both sets of mice, Tif1 γ level controls the TGF- β receptor 1 (Tgfr1) turnover and subtly regulates the number of myeloid-biased HSCs in bone marrow. We establish that young Tif1 γ ^{-/-} mice develop a phenotype of premature hematopoietic aging that may explain their predisposition to myeloproliferative disease.

Author contributions: R.Q., J.-N.B., and L.D. designed research; R.Q., L.S.-P., V.C., R.Z.M., M.-L.C., A.L., A.H., and J.-P.P.D.B. performed research; R.Q., L.S.-P., V.C., J.-N.B., and L.D. analyzed data; and R.Q., V.C., and L.D. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

Data deposition: The data reported in this paper have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) database, www.ncbi.nlm.nih.gov/geo (accession no. GSE57396).

¹To whom correspondence may be addressed. E-mail: laurent.delva@u-bourgogne.fr or ronan.quere@irse.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1405546111/-DCSupplemental.

lymphocytic activation molecule (SLAM) markers (SLAM cells), early HSCs ($\text{Lin}^- \text{Sca1}^+ \text{c-Kit}^+$; LSK cells), and progenitors [lineage-negative (Lin^-) cells] were found to be higher in young $\text{Tif1}\gamma^{-/-}$ mice and in old wt mice than in young wt mice, which is consistent with aging in hematopoiesis (Fig. 1A). Despite their proliferation in BM, HSCs showed a decreased capacity to differentiate and generate white cells in peripheral blood (PB), which also corroborates the aging phenotype of HSCs (Fig. 1B). We characterized the proportion of mature hematopoietic cells in PB and found that $\text{Tif1}\gamma^{-/-}$ HSCs displayed an increased propensity to differentiate toward myeloid, rather than lymphoid, lineages, which contributes to the decline in lymphopoiesis that accompanies aging (Fig. 1C). The decreased fitness of HSCs that occurs during aging led to an increased number of myeloid cells ($>2,500 \times 10^3/\text{mm}^3$ in PB) for $\sim 60\%$ of the wt mice reaching 20 mo of age (Fig. 1D). This phenotype is accelerated in $\text{Tif1}\gamma^{-/-}$ mice, whereas $\sim 60\%$ of them older than 4 mo already showed a myeloid cell count higher than $2,500 \times 10^3/\text{mm}^3$ (Fig. 1E). Hemocytometry also confirmed that young $\text{Tif1}\gamma^{-/-}$ and old wt mice showed very similar distributions for populations of granulocytes and monocytes (Fig. 1F). Because the accumulation of DNA repair defects characterizes aging of HSCs (23, 24), we quantified phosphorylation of the histone variant H2AX (γH2AX), a well-established indicator of DNA double-strand breaks, in SLAM cells by immunostaining. We found an increased number of DNA foci, which support the genomic instability in SLAM cells from $\text{Tif1}\gamma^{-/-}$ mice (SI Appendix, Fig. S1). The HSC population enters the cell cycle more frequently in old mice, which might be related to the increased incidence of leukemia (25, 26).

Interestingly, young $\text{Tif1}\gamma^{-/-}$ mice also showed elevated proliferation of the LSK cells containing HSCs and multipotential progenitors (SI Appendix, Fig. S2). Because current evidence links telomere shortening to aging and stem cell dysfunction (27), we measured the absolute telomere length and observed that both $\text{Tif1}\gamma^{-/-}$ and old LSK cells were characterized by a telomere shortening compared with young LSK cells (SI Appendix, Fig. S3A). Furthermore, the regulator of telomere length (*Rtel1*) mRNA involved in regulation of telomere size (28) was down-regulated in both $\text{Tif1}\gamma^{-/-}$ and old LSK cells compared with young cells (SI Appendix, Fig. S3B). Altered hematopoiesis in aging might also be a result of changed interactions of aged stem cells with the microenvironment. Although old HSCs have been described to localize more distantly to the endosteum (29), we also observed an altered endosteal location of $\text{Tif1}\gamma^{-/-}$ HSCs,

which reinforces the aged phenotype associated with HSCs (SI Appendix, Fig. S4). Hence, an accelerated aging-like phenotype occurs in hematopoiesis of $\text{Tif1}\gamma^{-/-}$ mice.

$\text{Tif1}\gamma^{-/-}$ Primitive Hematopoietic Cells Shows Alterations in Gene Expression Programs Comparable to Physiological Aging. To determine whether $\text{Tif1}\gamma^{-/-}$ and old HSCs share the same gene expression changes, we purified 200,000 LSK cells and performed high-throughput mRNA sequencing (RNA-seq). Statistical analysis uncovered 2.3% and 3.9% of the genes that were reciprocally up-regulated and down-regulated between young and $\text{Tif1}\gamma^{-/-}$ libraries ($P < 0.25$). Interestingly, 20% of the up-regulated genes and 26% of the down-regulated genes were differentially expressed during the physiological aging of HSCs (comparing the young versus the old libraries; $P < 0.25$; SI Appendix, Fig. S5). Using gene ontology clustering, we identified modulations of gene expression in different processes, such as transcription, signaling, RNA processing, growth and cell cycle, cytoskeleton, chromosome and telomere structure, cell adhesion and migration, metabolism and endocytosis/transport, and finally in response to cytokines and immune signaling (SI Appendix, Table S1). Two of these clusters were particularly pertinent: $\text{Tif1}\gamma^{-/-}$ and old HSCs shared the same lipid metabolism (SI Appendix, Fig. S6) and reduced expression of several growth factor receptors involved in hematopoiesis (SI Appendix, Fig. S7). Therefore, we can conclude that $\text{Tif1}\gamma^{-/-}$ hematopoietic cells show alterations in gene expression programs similar to physiological aging.

***Tif1* Expression Decreases in HSCs During Aging.** We isolated SLAM cells from either young or old wt mice and observed that *Tif1* mRNA was down-regulated during aging (Fig. 2A). To measure *Tif1* expression at the clonal level, single-SLAM cell gene expression analysis was performed as previously described (30). Although *Tif1* mRNA was detectable in more than 75% of these cells in young mice, only 37% of the clones in old mice expressed *Tif1* (Fig. 2B). Among the clones showing detectable levels of *Tif1*, the relative expression was found to be down-regulated during aging (Fig. 2C). Because the *Tif1* promoter contains a CpG-rich region, we analyzed the DNA methylation level of the *Tif1* promoter obtained from the DNA of sorted LSK cells of young and old mice, but no methylation was detected on the studied CpGs (SI Appendix, Fig. S8A). Quantitative chromatin immunoprecipitation assays on LSK cells revealed that global levels of acetylation of histone H3 at lysine 14 were

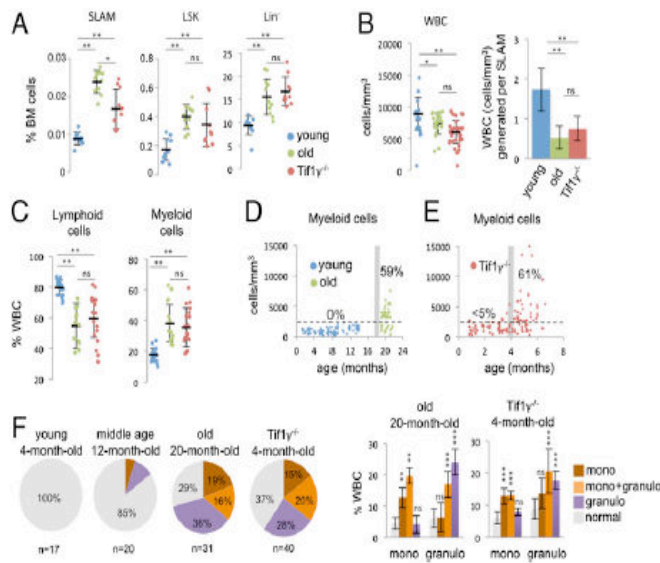


Fig. 1. Young $\text{Tif1}\gamma^{-/-}$ mice developed a premature aging phenotype. (A) Percentage of Lin^- cells, HSCs (LSK; $\text{c-Kit}^+ \text{Sca1}^+$), and LT-HSCs (SLAM; LSK $\text{CD48}^- \text{CD150}^+$) hematopoietic cells in total BM from 4-mo-old $\text{Tif1}\gamma^{-/-}$ mice ($\text{Tif1}\gamma^{-/-}$) and 20-mo-old (old) or 4-mo-old (young) wt mice (one dot = one mouse). Means ($n = 10$ mice); error bars represent SEM. (B) Number of WBCs/ mm^3 of PB and quantification of SLAM potency to generate WBCs ($n = 20$ –35 mice). (C) Lymphoid and myeloid cells in WBCs (%). Myeloid cells (% $\text{Mac1}^+ \text{Gr1}^+$). Lymphoid cells = B (% $\text{CD19}^+ \text{CD3}^-$) + T8 (% $\text{CD3}^+ \text{CD8}^+$) + T4 (% $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+$) ($n = 16$ –20 mice). (D) Total count of myeloid cells (hemocytometry) in PB from wt mice at different ages, younger than 18 mo ($n = 74$) and older than 18 mo ($n = 43$). (E) Total count of myeloid cells (hemocytometry) in PB from $\text{Tif1}\gamma^{-/-}$ mice younger than 4 mo ($n = 45$) and older than 4 mo ($n = 48$). Percentage of mice for which the total count of myeloid cells was more than $2,500 \times 10^3/\text{mm}^3$ is reported. (F) Mice were divided into three groups, according to whether they showed increased monocytes (mono), granulocytes (granulo), or monocytes plus granulocytes (mono+granulo). Monocytes and granulocytes measured (%) by hemocytometry in PB.

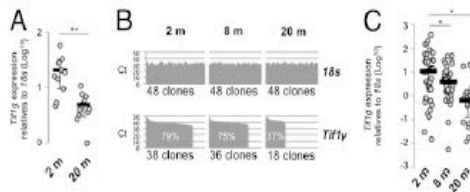


Fig. 2. HSCs isolated from old mice exhibited lower level of *Tif1γ* mRNA. (A) *Tif1γ* mRNA expression in 200 SLAM cells isolated from BM of 2-mo-old or 20-mo-old wt mice. Means ($n = 10$ mice); error bars represent SEM. (B) *Tif1γ* mRNA expression (RT-quantitative PCR) in 48 single SLAM cells isolated from BM of 2-mo-old, 8-mo-old, or 20-mo-old wt mice. The cycle threshold (Ct) and percentage of SLAM cells for which *Tif1γ* mRNA expression was detected are shown. (C) Relative expression among the population of single SLAM cell expressing *Tif1γ*. Means are shown; error bars represent SEM.

markedly decreased on the promoter of *Tif1γ* in old HSCs (*SI Appendix, Fig. S8B*). Collectively, these results demonstrate that the down-regulation of *Tif1γ* correlates with posttranslational modifications of histones.

***Tif1γ*^{-/-} HSCs Exhibit Stem Cell-Autonomous Parameters of HSC Aging and Are Myeloid-Biased.** To determine whether *Tif1γ*^{-/-} HSCs support stem cell-intrinsic mechanisms of HSC aging, we carried out competitive transplantation assays with SLAM cells isolated from *Tif1γ*^{-/-} CD45.2 mice transplanted into young CD45.1 wt mice. HSCs isolated from young *Tif1γ*^{-/-} and old wt mice exhibited myeloid-biased differentiation, which is characterized by an expanded production of granulocytes and monocytes, as well as a decreased percentage of B and T lymphocytes (Fig. 3A). These changes in mature hematopoietic cells were associated with profound alterations of early hematopoiesis in BM. Twenty-four weeks after transplantation, the proportions of donor-derived megakaryocyte-erythroid progenitors, common myeloid progenitors, and common lymphoid progenitors were significantly reduced, whereas donor-derived granulocyte-monocyte progenitors were found to have proliferated (Fig. 3B). Pre/proB and proE in *Tif1γ*^{-/-} BM also displayed identical behavior with those in physiologically aged BM (*SI Appendix, Fig. S9*). *Tif1γ*^{-/-} and old SLAM cells exhibited decreased reconstitution potential in BM compared with young SLAM cells (Fig. 3C). This also corroborates the deficient fitness observed in HSCs during aging. Together, these results indicate that *Tif1γ* deficiency leads to a cell-autonomous reduction in the ability of long term (LT)-HSCs to generate the earliest lymphoid and erythroid progenitors and in their capacity to produce more myeloid progenitors, which is phenotypically consistent with the aging of HSCs. We next carried out a clonal analysis of HSC expansion by transplanting single SLAM cell into lethally irradiated recipient mice together with support cells depleted from Sca-1⁺ HSCs. Long-term reconstitution was characterized 16 wk after transplantation, and the contribution of the clone was subdivided according to the granulocytes+monocytes/(B+T lymphocytes) [GM/(B+T)] ratio observed in PB to discriminate myeloid-dominant from lymphoid-dominant clones (13, 14). Myeloid-dominant clones represented 25% of the clones in young mice, and this population of myeloid-biased SLAM cells was found to be markedly increased in old wt and young *Tif1γ*^{-/-} mice; that is, these myeloid-restricted SLAM cells corresponded to 74% and 89% of the clones, respectively (Fig. 3D). Moreover, although myeloid-biased clones exhibited low contributions to the total circulating WBC (0.1–5%), lymphoid clones showed higher contributions (>5%). This finding provides evidence that *Tif1γ* finely controls the proportion of lymphoid/myeloid-derived HSCs.

***Tif1γ* Regulates the *Tgfb1* Level on HSCs.** Direct molecular studies of HSCs are hampered because of their low number in hematopoietic tissues. Thus, to elucidate a definite functional role for *Tif1γ*, we immortalized *Tif1γ*^{-/-} HSCs (Fig. 4A). We purified

LSK cells, which are enriched in HSCs and transduced them with the retroviral construct encoding the NUP98-HOXA9 oncogene. Both cell lines were easily grown in medium supplemented with IL-3, IL-6, and stem cell factor (SCF). Because *Tif1γ* has been shown to affect cell response to the TGF- β superfamily in different tissues (4, 16–18), we administered recombinant TGF- β 1 to the cells. It turned out that this ligand had a considerable antiproliferative effect on the *Tif1γ*^{-/-} line, but not on the wt line (Fig. 4B), thus supporting the hypothesis that loss of *Tif1γ* would make HSCs more sensitive to TGF- β 1. *Tif1γ* has been described as acting as an E3 ubiquitin ligase on Smad4 to regulate the TGF- β pathway (16, 17). We decided to test the administration of recombinant Activin A, also known to stimulate Smad4 signaling (31). Interestingly, exposure to Activin A did not have an antiproliferative effect on *Tif1γ*^{-/-} cells (Fig. 4B). Therefore, the increased sensitivity of the *Tif1γ*^{-/-} line to TGF- β 1 cannot be explained by the control of the intracellular level of Smad4 protein by *Tif1γ*. This is corroborated by the fact that Smad4 was not differentially expressed in the *Tif1γ*^{-/-} line compared with the wt line (Fig. 4C). Although the *Tif1γ*^{-/-} line was only sensitive to TGF- β 1 and not to Activin A, we examined the protein expression of the TGF- β receptor 1 (*Tgfb1*, *Alk5*). Surprisingly, its expression was more than 4 times greater in the *Tif1γ*^{-/-} line compared with in the wt line (Fig. 4C and D). As both cell lines expressed the same level of *Tgfb1* mRNA (Fig. 4E), we hypothesized a posttranscriptional regulation of *Tgfb1*. Indeed, the *Tgfb1* protein was very stable in the *Tif1γ*^{-/-} line

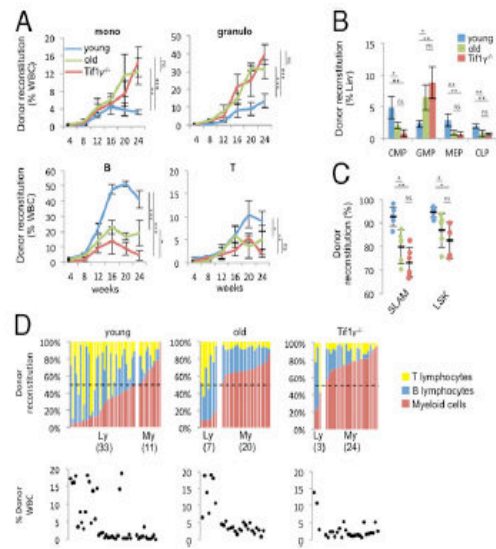


Fig. 3. *Tif1γ*^{-/-} HSCs showed stem cell-intrinsic parameters of HSC aging. (A) Long-term competitive reconstitution assay in recipient mice transplanted with 100 SLAM cells isolated from 4-mo-old *Tif1γ*^{-/-} or 20-mo-old or 4-mo-old wt donor mice ($n = 7$ recipients). Monocytes (mono; Mac1⁺Gr1^{hi}), granulocytes (granulo; Mac1⁺Gr1^{lo}), B lymphocytes (B; CD19⁺CD3⁻), T lymphocytes (T = T8 + T4; CD3⁺CD8⁺ + CD3⁺CD4⁺). (B, C) Donor-derived HSCs and progenitors (%) in the BM of mice that were long-term reconstituted with 100 SLAM cells 24 wk after transplantation ($n = 7$ recipients). (D) Long-term reconstitution assay in PB of recipient mice transplanted with single SLAM cell isolated from *Tif1γ*^{-/-} ($n = 25$ recipients) or old ($n = 20$) or young ($n = 45$) wt donor mice. Sixteen weeks posttransplantation, clones were subdivided according to their contribution to the circulating myeloid/lymphoid cells (number of clones are in parenthesis). Myeloid cells (Mac1⁺Gr1⁺), B lymphocytes (CD19⁺CD3⁻), and T lymphocytes (CD3⁺CD8⁺ + CD3⁺CD4⁺). Myeloid-biased (My) clones display more than 50% myeloid/lymphoid cells, whereas lymphoid-derived (Ly) clones display fewer than 50% myeloid/lymphoid cells.

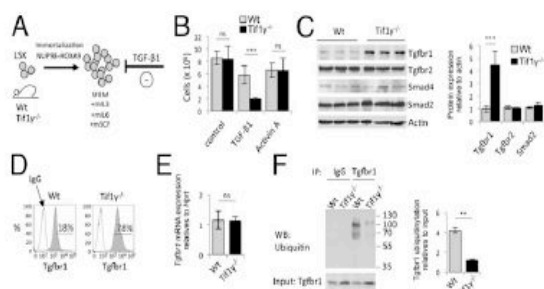


Fig. 4. $Tif1\gamma^{-/-}$ HSCs expressed higher levels of the TGF- β 1 receptor, which is not polyubiquitinated. (A) Strategy for immortalizing $Tif1\gamma^{-/-}$ and wt HSCs with the NUP98-HOXA9 oncogene. (B) Growth of $Tif1\gamma^{-/-}$ and wt lines with administration of recombinant TGF- β 1 or Activin A (10 ng/mL) after 7 d of culture. (C) WB and quantification of several key proteins of the TGF- β pathway using total proteins from $Tif1\gamma^{-/-}$ and wt lines. Mean proportions are shown ($n = 3$); error bars represent SEM. (D) Quantification of *Tgfb1* by FACS. Staining with isotype control antibody IgG is shown. (E) qPCR of *Tgfb1* mRNA in $Tif1\gamma^{-/-}$ and wt lines ($n = 3$). (F) Immunoprecipitation with anti-Tgfb1 followed by WB with anti-Ubiquitin, using total proteins from $Tif1\gamma^{-/-}$ and wt lines treated with MG132, a proteasome inhibitor, for 4 h ($n = 2$).

(SI Appendix, Fig. S10). In addition to its role as a transcription factor, *Tif1* γ is known to display polyubiquitin ligase activity (16, 17). To determine whether *Tif1* γ could regulate *Tgfb1* through ubiquitinylation, both lines were treated with MG132, a proteasome inhibitor. Pull-down assays showed that polyubiquitinylation of *Tgfb1* in the $Tif1\gamma^{-/-}$ line was lower than that in the wt line (Fig. 4F). Thus, *Tif1* γ regulates the TGF- β 1 receptor turnover via its ubiquitin ligase activity.

Tgfb1 Level Is Increased on SLAM Cell Isolated From Young $Tif1\gamma^{-/-}$ and Old WT Mice. To establish a correlation between the increased level of *Tgfb1* in $Tif1\gamma^{-/-}$ HSCs and physiological aging of HSCs, we isolated SLAM cells from $Tif1\gamma^{-/-}$ mice and old or young wt mice. *Tgfb1* expression demonstrated that SLAM cells harboring high levels of the TGF- β 1 receptor (*Tgfb1*^{hi} cells) were positive for phospho-Smad2/3, which indicated greater activation of the TGF- β pathway (Fig. 5). A higher percentage of the *Tgfb1*^{hi} SLAM cell subset was observed in $Tif1\gamma^{-/-}$ (48.8%) and old wt SLAM (47.2%) cells than in young wt SLAM cells (22.1%).

$Tif1\gamma^{-/-}$ and Old HSCs Are Very Sensitive to TGF- β Signaling. We gave three i.p. injections of 5 μ g/kg TGF- β 1 24 h apart and analyzed PB 48 h after the last injection. As reported (22), exposure to TGF- β 1 stimulated myeloid-HSCs with a significant increase in myeloid cells in young wt mice (Fig. 6A). In contrast, we observed a striking reduction in myeloid cell production in both $Tif1\gamma^{-/-}$ and old mice treated with TGF- β 1 (Fig. 6A). The TGF- β signaling pathway has long been implicated in regulating HSC quiescence (19, 20, 32). Although $Tif1\gamma^{-/-}$ and old HSCs expressed high levels of *Tgfb1*, we analyzed the effect of high dose of TGF- β 1 on HSCs. We also observed an increased proportion of dormant HSCs in BM from $Tif1\gamma^{-/-}$ and old mice treated with recombinant TGF- β 1, whereas the treatment did not affect the quiescence of young HSCs (SI Appendix, Fig. S11). TGF- β is generally cataloged as one of the most potent inhibitors of HSC growth (31). Several molecular mechanisms have been proposed to account for TGF- β -mediated growth inhibition, including up-regulation of cyclin-dependent kinase inhibitors, among which p57 has been identified as the most significantly up-regulated by TGF- β (19). After injection of recombinant TGF- β 1 in vivo, HSCs exposed to a high level of TGF- β 1 were analyzed ex vivo, and we observed an important up-regulation of p57 in $Tif1\gamma^{-/-}$ and old HSCs compared with young HSCs (SI

Appendix, Fig. S12). Although $Tif1\gamma^{-/-}$ and old HSCs expressed a high level of *Tgfb1*, they were more sensitive to TGF- β signaling under a high dose of TGF- β 1 and were subject to antiproliferative effect and became more dormant in BM, which explains the reduced number of myeloid cells in PB. A high level of TGF- β 1 has therefore rescued the biased myeloproliferation in old and $Tif1\gamma^{-/-}$ mice. Importantly, this effect was reversed on addition of the TGF- β type I receptor inhibitor SB431542, which is known to remove HSCs from their quiescence, and therefore intensified the myeloproliferation in $Tif1\gamma^{-/-}$ and old mice (SI Appendix, Fig. S13). To accurately assess the in vivo response of HSCs to TGF- β 1, we competitively transplanted 200,000 CD45.2 BM cells isolated from $Tif1\gamma^{-/-}$, old or young mice, with 200,000 CD45.1 young supported BM cells. After stable hematopoietic reconstitution (12 wk posttransplantation), the mice were injected with 5 μ g/kg TGF- β 1 (Fig. 6B). TGF- β 1 caused a slight expansion of the young donor population and significantly affected the expansion of both $Tif1\gamma^{-/-}$ and old donor cells. Furthermore, although the injection of TGF- β 1 produced a significant stimulatory myeloid proliferation of the young donor cells, it blocked the myeloid proliferation of both $Tif1\gamma^{-/-}$ and old donor cells.

Identification of Myeloid-Biased HSCs Expressing a High Level of *Tgfb1*.

To provide evidence of heterogeneity and to discriminate HSCs according to *Tgfb1* expression, we prospectively isolated two subpopulations of SLAM cells expressing *Tgfb1* with either high (*Tgfb1*^{hi}) or low (*Tgfb1*^{lo}) rates (Fig. 7A). Remarkably, *Tif1* γ mRNA expression was decreased in *Tgfb1*^{hi} SLAM cells (Fig. 7B). Sorted cells were isolated from CD45.1 mice and transplanted in a competitive manner into CD45.2 mice. Sixteen weeks after transplantation, *Tgfb1*^{hi} SLAM cells showed a significantly lower contribution to the total circulating WBC, with 13% versus 35% obtained with *Tgfb1*^{lo} SLAM cells (Fig. 7C). Although *Tgfb1*^{lo} SLAM cells reconstituted both myeloid and lymphoid lineages, *Tgfb1*^{hi} SLAM cells exhibited myeloid-biased differentiation, which is characterized by the exclusive production of myeloid cells in PB and very low reconstitution of both B and T lymphoid lineages (Fig. 7D). *Tgfb1*^{hi} SLAM cells displayed an increased propensity to generate more granulocyte-monocyte progenitors and a reduced capacity to produce the earliest common lymphoid progenitors and megakaryocyte-erythroid progenitors (SI Appendix, Fig. S14). When we analyzed BM from mice reconstituted with either *Tgfb1*^{lo} or *Tgfb1*^{hi} SLAM cells, donor *Tgfb1*^{lo} SLAM cells were twice as represented as *Tgfb1*^{hi} SLAM cells (Fig. 7E), indicating that *Tgfb1*^{hi} SLAM cells displayed a reduced propensity to reconstitute the hematopoietic system under competitive transplantation settings. However, the percentage of donor-derived Lin⁻ cells did not show any significant difference (Fig. 7F). Therefore, *Tgfb1*^{hi} SLAM cells produce more donor-derived progenitors. In conclusion, *Tgfb1*^{hi} SLAM cells share several features with SLAM cells isolated from both old and $Tif1\gamma^{-/-}$ mice. *Tgfb1* is a novel positive marker of myeloid-derived HSCs (Fig. 7G).

Discussion

We confirmed reports describing an alteration in the composition of the HSC compartment during aging and provided support

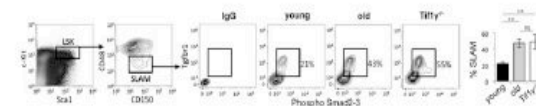


Fig. 5. $Tif1\gamma^{-/-}$ and old HSCs expressed a higher level of the TGF- β 1 receptor. Quantification (FACS) of SLAM cells expressing high levels of *Tgfb1* (*Tgfb1*^{hi}) from 4-mo-old $Tif1\gamma^{-/-}$ mice ($Tif1\gamma^{-/-}$) or 20-mo-old (old) or 4-mo-old (young) wt mice ($n = 5$ mice). Means are shown; error bars represent SEM. Cells were directly analyzed ex vivo without any stimulation.

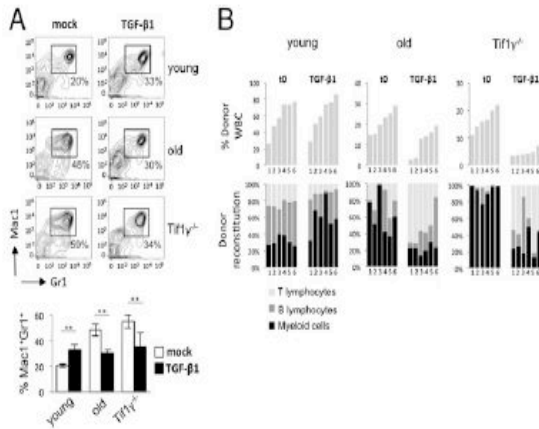


Fig. 6. *Tif1 γ ^{-/-}* and old HSCs were extremely sensitive to TGF- β signaling. (A) Mice received three injections of 5 μ g/kg TGF- β 1, 24 h apart, and PB was analyzed 48 h after the last injection. PBS1x was used as control (mock). Data show the percentage of myeloid cells (Mac1⁺Gr1⁺) for three mice in each group. (B) Effect of the recombinant TGF- β 1 injected in young recipient mice reconstituted with *Tif1 γ ^{-/-}* BM (*Tif1 γ ^{-/-}*) or old or young wt BM at 12 wk. Mice ($n = 6$) were monitored before the TGF- β 1 treatment (t0) or after injection (TGF- β 1). Myeloid cells (Mac1⁺Gr1⁺), B lymphocytes (CD19⁺CD3⁻), and T lymphocytes (CD3⁺CD8⁺ + CD3⁺CD4⁺).

to the idea that aging modifies the clonal composition of the HSC compartment because of a relative expansion of myeloid-biased HSCs (13, 14, 22, 33, 34). We proved that young *Tif1 γ ^{-/-}* HSCs supported stem cell-autonomous parameters of HSC aging. When HSCs were transplanted into recipient mice, they exhibited similar properties of deficient competitive fitness, reduced ability to produce lymphoid and erythroid progenitors, and increased capacity to generate more myeloid progenitors. In our single-cell transplantation assay, myeloid-biased clones did not contribute much to WBCs (0.1–5%), whereas lymphoid/myeloid-balanced clones made a greater contribution (>5%). This finding underlines the small contribution of SLAM cells in old and *Tif1 γ ^{-/-}* mice to total circulating WBC compared with the higher contribution of young SLAM cells.

We demonstrated for the first time to our knowledge that two populations of HSCs coexist, depending on the level of expression of the TGF- β 1 receptor. Remarkably, using *Tgfb1* as a marker to discriminate between HSC-containing populations in transplantation studies, we provided evidence of the capture of myeloid-biased (*Tgfb1*^{hi} HSCs) and myeloid-lymphoid-balanced HSCs (*Tgfb1*^{lo} HSCs). We found that myeloid-biased *Tgfb1*^{hi} cells became the dominant HSC subtype in young *Tif1 γ ^{-/-}* mice, which developed a premature hematopoietic aging phenotype, and in old mice during physiological hematopoietic aging. Indeed, in young mice, one fifth of the SLAM cells expressed *Tgfb1*^{hi}, whereas this proportion increased significantly to reach almost half of HSCs in both *Tif1 γ ^{-/-}* and old wt mice. *Tgfb1*^{hi} SLAM cells generated more progenitors in BM, but those progenitors have reduced contribution to the total circulating WBC.

Important hematopoietic growth factor receptors were repressed in *Tif1 γ ^{-/-}* and old HSCs. Remarkably, some of them are known to be down-regulated by TGF- β 1. First, the expression of IL-3 and IL-6 receptors is inhibited by TGF- β 1 (35, 36), and both IL-3 and IL-6 are markers in the differentiation/activation of lymphocytes. Second, TGF- β 1 is known to transcriptionally repress the class II transactivator, which down-regulates the class II MHC expression (37, 38). Third, TGF- β 1 inhibits the IFN-induced signaling (12, 39). Notably, the IFN-inducible gene *Irf8* has been identified as one of the most relevant down-regulated markers in aging HSCs (40), and *Irf8*^{-/-} mice had significantly increased myeloid cell number (41). In conclusion, increased

TGF- β signaling reduces the expression of further signaling growth factors and potentiates myeloid cell commitment.

Tif1 γ can act as an E3 ubiquitin ligase on Smad4 to regulate the TGF- β pathway (16, 17). We therefore tested the effect of two ligands (TGF- β 1 and Activin A) that activate Smad4 signaling (31, 42) and showed that the increased sensitivity of *Tif1 γ ^{-/-}* hematopoietic cells to TGF- β was not related to intracellular Smad4 protein, and that *Tif1 γ ^{-/-}* cells were only sensitive to TGF- β 1 and not to Activin A. We revealed that *Tif1 γ* regulates the TGF- β signaling by controlling the level of the TGF- β receptor 1 in hematopoietic cells. Even though *Tif1 γ* has been reported to act as a crucial regulator of transcription during hematopoiesis (3, 5), we found no evidence of transcriptional regulation of the *Tgfb1* gene in *Tif1 γ ^{-/-}* hematopoietic cells. Nevertheless, we highlighted that *Tif1 γ* modulated *Tgfb1* polyubiquitylation and turnover. Importantly, TGF- β 1 receptor signaling and turnover have been reported to be controlled by other E3 ubiquitin ligases in several tissues (43, 44).

The accumulation of DNA damage is a marker of HSC aging (23, 24). *Tif1 γ* is required for efficient DNA repair, as *Tif1 γ -deficient* cells show enhanced sensitivity to DNA damage (45). During aging, HSC expressed lower levels of *Tif1 γ* and consequently increased frequency of histone γ H2AX DNA repair. Our study also suggests that the role of *Tif1 γ* on the *Tgfb1* regulation was probably not directly involved in DNA damage response but, rather, only in the control of the myeloid HSC expansion.

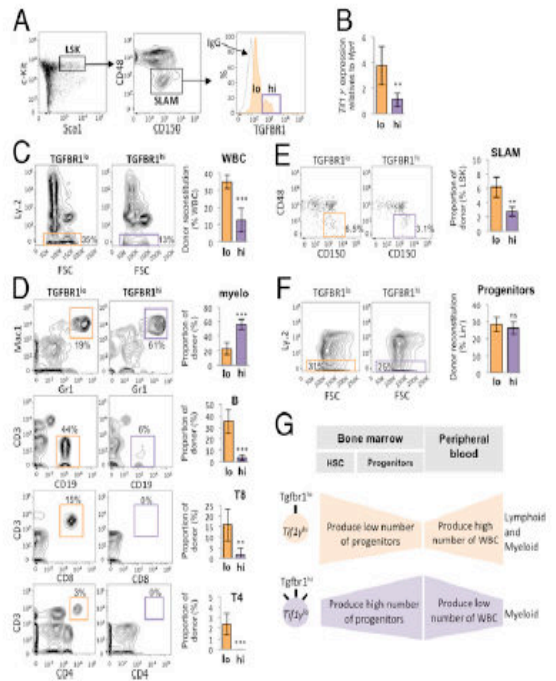


Fig. 7. High expression of *Tgfb1* affords the capture of myeloid-derived HSCs. (A) Strategy for isolation of *Tgfb1*^{lo} and *Tgfb1*^{hi} SLAM cells from 4-mo-old donor mice. (B) Quantification of *Tif1 γ* mRNA (qPCR) in the two subpopulations. Means are shown ($n = 5$ mice); error bars represent SEM. (C) Donor contribution in PB (%WBC) of recipients transplanted either with 30 *Tgfb1*^{lo} or *Tgfb1*^{hi} SLAM cells at 16 wk. Representative FACS plots, means ($n = 5$ recipients); error bars show SEM. (D) Lineage distribution in PB at 16 wk. Myeloid cells (myelo; Mac1⁺Gr1⁺), B lymphocytes (B; CD19⁺CD3⁻), T lymphocytes (T8; CD3⁺CD8⁺ and T4; T4, CD3⁺CD4⁺). Representative FACS plots, means ($n = 5$ recipients); error bars show SEM. (E, F) Representative FACS plots of donor SLAM (E) or Lin⁻ cells (F) in BM of mice, reconstituted with 30 *Tgfb1*^{lo} or *Tgfb1*^{hi} SLAM, 16 wk after transplantation. Means ($n = 5$ mice); error bars represent SEM. (G) Illustration of the heterogeneity observed among SLAM cells that can be subdivided in *Tgfb1*^{lo} and *Tgfb1*^{hi} cells.

The injection of a high dose of TGF- β 1 significantly stimulates myeloid proliferation of young donor cells (22). Our data corroborated this when young recipient mice were treated with high dose of TGF- β 1. In old wt and young *Tif1y*^{-/-} mice, HSCs expressed a higher level of the TGF- β 1 receptor, indicating their greater sensitivity under a physiological level of TGF- β . As a consequence, this leads to myeloid proliferation at low rate of TGF- β . Conversely, under a high dose of TGF- β 1, *Tif1y*^{-/-} and old wt myeloid HSCs become too sensitive to TGF- β 1, stop their proliferation, and enter quiescence.

In summary, this study unveils an unsuspected role for *Tif1y* in controlling TGF- β receptor 1 signaling to finely control the proportion of lymphoid/myeloid-derived HSCs and suggests more broadly its mechanistic role in HSC aging through the TGF- β signaling pathway. Changes in the biological function and decreased fitness of old HSCs have been directly linked to the development of several hematological disorders. Here, we characterized the first physiological step that may lead to the development of a myeloproliferative disease in *Tif1y*^{-/-} mice through the premature aging of HSCs.

Materials and Methods

Tif1y^{-/-} mice were genotyped according to described procedures (6). Purified cells were sorted at indicated doses and mixed with 2×10^5 unfractionated

support BM cells from a congenic strain. For single-cell transplantation, recipient mice were transplanted with Sca-1-depleted support BM cells. Cells were transplanted into the tail vein of lethally irradiated (900cGy) recipients. PB was collected from the tail vein. Erythrocytes were lysed with NH₄Cl, and remaining WBCs were analyzed by FACS. Hematologic cells were counted using a hemocytometer (SCL Vet ABC[®]). Three doses of 5 μ g/kg TGF- β 1 at 24 h apart (22) were injected into the tail vein of *Tif1y*^{-/-}, old and young mice, or in secondary recipients, 12 wk posttransplantation. PB or BM were then monitored 48 h after the last injection. Statistics, molecular, biological, and other analyses were performed as described in *SI Appendix, Materials and Methods*.

ACKNOWLEDGMENTS. We are grateful to Cédile Choux for her technical help for the design of primers to study methylation and Philip Bastable for critical reading of this manuscript. This study was supported by a French government grant managed by the National Research Agency (ANR-12-BSV1-0001-01) and by grants from Ligue contre le Cancer (Grand Est), Association pour la Recherche sur le Cancer, Cent Pour Sang La Vie, Conseil Régional de Bourgogne (CRB), and the National Research Agency under the program Investissements d'Avenir (ANR-11-LABX-0021, LipSTIC Labex). R.Q. was supported by fellowships from the Association pour la Recherche sur le Cancer, the National Research Agency, and CRB; L.S.-P. was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)/CRB; V.C. was supported by CRB; R.Z.M. was supported by a French government grant; and A.L. was supported by INSERM/CRB and Société Française d'Hématologie.

- Venturini L, et al. (1999) TIF1gamma, a novel member of the transcriptional intermediary factor 1 family. *Oncogene* 18(5):1209-1217.
- Yan KP, et al. (2004) Molecular cloning, genomic structure, and expression analysis of the mouse transcriptional intermediary factor 1 gamma gene. *Gene* 334:3-13.
- Kusy S, et al. (2011) Adult hematopoiesis is regulated by TIF1 γ , a repressor of TAL1 and PU.1 transcriptional activity. *Cell Stem Cell* 8(4):412-425.
- He W, et al. (2006) Hematopoiesis controlled by distinct TIF1gamma and Smad4 branches of the TGFbeta pathway. *Cell* 125(5):929-941.
- Ransom DG, et al. (2004) The zebrafish moonshine gene encodes transcriptional intermediary factor 1gamma, an essential regulator of hematopoiesis. *PLoS Biol* 2(8):E237.
- Aucagne R, et al. (2011) Transcription intermediary factor 1 γ is a tumor suppressor in mouse and human chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Invest* 121(6):2361-2370.
- Bai X, et al. (2013) TIF1-gamma plays an essential role in murine hematopoiesis and regulates transcriptional elongation of erythroid genes. *Dev Biol* 373(2):422-430.
- Henry CJ, Marusyk A, DeGregori J (2011) Aging-associated changes in hematopoiesis and leukemogenesis: what's the connection? (Translated from eng). *Aging (Albany, NY Online)* 3(6):643-656.
- de Haan G, Van Zant G (1999) Dynamic changes in mouse hematopoietic stem cell numbers during aging. *Blood* 93(10):3294-3301.
- Rossi DJ, et al. (2005) Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(26):9194-9199.
- Sudo K, Ema H, Morita Y, Nakauchi H (2000) Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 192(9):1273-1280.
- Geiger H, de Haan G, Florian MC (2013) The ageing haematopoietic stem cell compartment. *Nat Rev Immunol* 13(5):376-389.
- Benz C, et al. (2012) Hematopoietic stem cell subtypes expand differentially during development and display distinct lymphopoietic programs. *Cell Stem Cell* 10(3):273-283.
- Dykstra B, et al. (2007) Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs in vivo. *Cell Stem Cell* 1(2):218-229.
- Xi Q, et al. (2011) A poised chromatin platform for TGF- β access to master regulators. *Cell* 147(7):1511-1524.
- Dupont S, et al. (2009) FAMU59P9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGFbeta signaling, controls Smad4 monoubiquitination. *Cell* 136(1):123-135.
- Dupont S, et al. (2005) Germ-layer specification and control of cell growth by Ectoderm, a Smad4 ubiquitin ligase. *Cell* 121(1):87-99.
- Morsut L, et al. (2010) Negative control of Smad activity by ectoderm/Tif1gamma patterns the mammalian embryo. *Development* 137(15):2571-2578.
- Yamazaki S, et al. (2009) TGF-beta as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation. *Blood* 113(6):1250-1256.
- Fortune N, et al. (2000) Release from quiescence of primitive human hematopoietic stem/progenitor cells by blocking their cell-surface TGF-beta type II receptor in a short-term in vitro assay. *Stem Cells* 18(2):102-111.
- Yamazaki S, et al. (2006) Cytokine signals modulated via lipid rafts mimic niche signals and induce hibernation in hematopoietic stem cells. *EMBO J* 25(15):3515-3523.
- Challen GA, Boles NC, Chambers SM, Goodell MA (2010) Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF-beta1. *Cell Stem Cell* 6(3):265-278.
- Rossi DJ, et al. (2007) Deficiencies in DNA damage repair limit the function of hematopoietic stem cells with age. *Nature* 447(7145):725-729.
- Nijnik A, et al. (2007) DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. *Nature* 447(7145):686-690.
- Morrison SJ, Wandycz AM, Akashi K, Globerson A, Weissman IL (1996) The aging of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 2(9):1011-1016.
- Pang WW, et al. (2011) Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(50):20012-20017.
- Blasco MA (2007) Telomere length, stem cells and aging. *Nat Chem Biol* 3(10):640-649.
- Ding H, et al. (2004) Regulation of murine telomere length by Rtel: an essential gene encoding a helicase-like protein. *Cell* 117(7):873-886.
- Köhler A, et al. (2009) Altered cellular dynamics and endosteal location of aged early hematopoietic progenitor cells revealed by time-lapse intravital imaging in long bones. *Blood* 114(2):290-298.
- Ramos CA, et al. (2006) Evidence for diversity in transcriptional profiles of single hematopoietic stem cells. *PLoS Genet* 2(9):e159.
- Blank U, Karlsson G, Karlsson S (2008) Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood* 111(2):492-503.
- Yamazaki S, et al. (2011) Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell* 147(5):1146-1158.
- Beerman I, et al. (2010) Functionally distinct hematopoietic stem cells modulate hematopoietic lineage potential during aging by a mechanism of clonal expansion. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(12):5465-5470.
- Cho RH, Sieburg HB, Muller-Sieburg CE (2008) A new mechanism for the aging of hematopoietic stem cells: aging changes the clonal composition of the stem cell compartment but not individual stem cells. *Blood* 111(12):5553-5561.
- Fortune N, et al. (1998) High proliferative potential-quiescent cells: a working model to study primitive quiescent hematopoietic cells. *J Cell Sci* 111(Pt 13):1867-1875.
- Jacobsen SE, et al. (1991) Transforming growth factor-beta transmodulates the expression of colony stimulating factor receptors on murine hematopoietic progenitor cell lines. *Blood* 77(8):1706-1716.
- Lee YJ, et al. (1997) TGF-beta suppresses IFN-gamma induction of class II MHC gene expression by inhibiting class II transactivator messenger RNA expression. *J Immunol* 158(5):2065-2075.
- Nandan D, Reiner NE (1997) TGF-beta attenuates the class II transactivator and reveals an accessory pathway of IFN-gamma action. *J Immunol* 158(3):1095-1101.
- Gekas C, Graf T (2013) CD41 expression marks myeloid-biased adult hematopoietic stem cells and increases with age. *Blood* 121(22):4463-4472.
- Stirewalt DL, et al. (2009) Decreased IRF8 expression found in aging hematopoietic progenitor/stem cells. *Leukemia* 23(2):391-393.
- Wang H, et al. (2008) IRF8 regulates B-cell lineage specification, commitment, and differentiation. *Blood* 112(10):4028-4038.
- Blank U, Karlsson S (2011) The role of Smad signaling in hematopoiesis and translational hematopoiesis. *Leukemia* 25(9):1379-1388.
- Di Guglielmo GM, Le Roy C, Goodfellow AF, Wrana JL (2003) Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol* 5(5):410-421.
- Kavak P, et al. (2000) Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell* 6(6):1365-1375.
- Kulkarni A, Oza J, Yao M, et al. Tripartite Motif-containing 33 (TRIM33) protein functions in the poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)-dependent DNA damage response through interaction with Amplified in Liver Cancer 1 (ALC1) protein. *J Biol Chem*. 2013;288(45):32357-32369.

Supplementary Material and Methods, Supplementary References and Supplementary Figures

Supplementary Material and Methods

Isolation of BM cells from mice and transplantation

C57Bl/6 (CD45.2) and congenic B6.SJL (CD45.1) mice were kept in the Animal Facility at the University of Burgundy. The Ethics Committee for Animal Welfare of the University of Burgundy approved all animal experiments. *Tif1 γ ^{-/-}* mice were genotyped according to previously described procedures (1). Purified cells were sorted at indicated doses and mixed with 2×10^5 unfractionated support BM cells from a congenic strain. For single cell transplantation, recipient mice were transplanted with Sca-1-depleted support BM cells. The cell suspension was transplanted into the tail vein of lethally irradiated (900 cGy) recipients. PB was collected from the tail vein. Erythrocytes were lysed with NH₄Cl and the remaining cells were stained with conjugated antibodies for FACS analysis. Hematopoietic cells were counted using a hemocytometer (SCIL Vet ABC⁺). Three doses of 5 μ g/Kg TGF- β 1 at 24h apart (2, 3) were injected into the tail vein of *Tif1 γ ^{-/-}*, old and young mice or in secondary recipients, 12 weeks post-transplantation. PB or BM were then monitored 48h after the last injection. Mice received two intraperitoneal injections of 4 μ mol/Kg of the SB431542 (R&D). Animals received two injections of the inhibitor, 24h apart, and PB was analyzed one week after the last injection.

Flow cytometry and sorting

Magnetically lineage-depleted BM cells (Miltenyi) were stained in PBS1x with combinations of antibodies. For the lineage staining in bone marrow, c-Kit-PE-Cy7, CD34-APC, CD135-PE, CD48-PE, CD48-BV421, CD16/32-FITC, IL7 α -PE-CF594 antibodies (BD Biosciences) and CD150-APC, Sca-1-APC-Cy7 antibodies (Biolegend) were used. For the lineage staining in peripheral blood, CD4-PE-CF594, CD8-APC, Mac1-APC-Cy7, Mac1-PE-Cy7, GR-1-FITC, GR-1 PE antibodies (BD Biosciences) and CD19-PE, CD3-PB antibodies (Biolegend) were used. To separate donor cells from support and recipient cells, CD45.2 (Ly.2)-FITC, CD45.2 (Ly.2)-PE-Cy7, CD45.1 (Ly.1)-FITC and CD45.1 (Ly.1)-PE-Cy5.5 antibodies were used (BD Biosciences). Ki67 Flow Kit was used for cell cycle analysis (BD Biosciences). Mice were injected intraperitoneally with 100 μ L of 10mg of BrdU/mL and sacrificed 24 hours after the injection. Immunofluorescent staining was performed with anti-BrdU antibody, using the cell proliferation kit (BD Biosciences). γ H2AX staining was performed using the DNA damage kit (BD Biosciences). The TGF- β signaling pathway was studied with phospho-Smad2/Smad3-PE-CF594 (BD Biosciences), Tgfbr1-PE (clone 141231, R&D), and Tgfbr1 (clone ab31013, Abcam) antibodies with secondary anti-rabbit AF488 or anti-rabbit-PE (Life technologies). For the lineage staining of pre-B, pro-B and pre-pro-B on total bone marrow, c-Kit-PE-Cy7, B220-APC-Cy7, IL7 α -PE-CF594 and AA4.1-FITC antibodies (BD Biosciences) were used. For the staining of proE, basoE, chromaE and orthoE

on total bone marrow, CD71-PE and biotinylated Ter119 antibodies (BD Biosciences) were used. Biotinylated Ter119 was identified using streptavidin V500 (BD Biosciences). To analyze receptors on LSK, we used FITC antibody anti-MHC class II (Miltenyi), and biotinylated antibodies anti-TNFR type I/p55, anti-TNFR type II/p75, anti-IFN- γ R α , anti-IFN- α / β R1, anti-IL-6R α and anti-IL-3R α (Biolegend). FITC Streptavidin (Biolegend) was used to detect biotinylated antibodies. AF488-conjugated Cholera Toxin Subunit B (Sigma Aldrich) was used to stain lipid rafts. Cells were analyzed on a FACS LSRII flow cytometer (BD Biosciences). Cells were sorted on a FACS Aria cell sorter (BD Biosciences). Data were analyzed using FlowJo software (TreeStar Inc).

Immunostaining

For DNA damage analysis, SLAM cells were sorted on glass slides and stained with the γ H2AX-AF488 antibody (BD Biosciences) and DAPI (BD Biosciences) using a kit for intra cellular staining (BD Biosciences). DNA foci were quantified by microscopy (Leica DM-IRB, magnification x40). For endosteal location of HSCs in bone marrow, one hundred SLAM cells were isolated from 4-month-old *Tif1 γ ^{-/-}* mice (Ly.2), 20-month-old or 4-month-old wild type mice (Ly.2) and transplanted into lethally irradiated recipient Ly.1 mice. Twelve weeks after transplantation, mice were euthanized and femur fixed and decalcified with Decalcifying Solution-Lite (Sigma). Bone marrow frozen sections were analyzed by immunostaining (CellimaP, Dijon) with a biotinylated anti-CD45.2 (Ly.2) antibody and streptavidin-PE.

RNA-Seq

For high-throughput mRNA sequencing (RNA-seq), we sorted and pooled 200,000 LSK from five *Tif1 γ ^{-/-}* mice, five 20-month-old wt mice and ten 4-month-old wt mice. Wt mice used were littermate controls. RNA was extracted (RNeasy Mini Kit, Qiagen) and concentrated (RNeasy MinElute Spin Columns, Qiagen). RNA-seq was performed by the ProfileXpert platform (University of Lyon1, France). RNA was quantified (Qubit, Life technologies) and quality was monitored using a Bioanalyzer (Agilent Technologies). Libraries were generated with 200ng of total RNA using the TruSeq RNA Kit (TruSeq SR V3, Illumina) and sequencing was performed on a HiSeq 2000 using the TruSeq SBS Version3 kit (Illumina), which generate 51bp single reads. For each library, more than 75 millions of reads were generated. Analysis of RNA-seq for differential gene and transcript expression was done following TopHat and Cufflinks informatics procedures (4). Genes were called differentially expressed when $p < 0.25$. The RNA-seq data have been deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) (<http://ncbi.nlm.nih.gov/geo>) and can be found at accession number GSE57396.

Retroviral transduction

NUP98-HOXA9 (MSCV-IRES-GFP) retroviral vector was transfected into Phoenix Amphi cells (Nolan laboratory) and supernatants were harvested for infection of FACS-sorted LSK isolated from *Tif1 γ ^{-/-}* or wt mice. HSCs expressing GFP were sorted and maintained in culture for immortalization in SFEM medium (MethoCult, StemCell Technologies) supplemented with mIL3, mIL6 and mSCF (Miltenyi). Immortalized lines were treated with 10ng/mL of the recombinant TGF- β 1, Activin A (R&D), 10 μ M of MG132 (R&D), 50 μ g/mL of cycloheximide (Sigma-Aldrich).

Western blot and Immunoprecipitation

Antibodies used for Western blotting were anti-Tgfb1 (clone 141231, R&D), anti-Tgfb2 (clone 129502, R&D), anti-Smad2 (clone D43B4, Cell Signaling), anti-Smad4 (9515,

Cell Signaling). For immunoprecipitation, anti-Tgfb β 1 (clone ab125310, Abcam) was used, and followed by a Western blot using the anti-Ubiquitin (clone P4D1, Cell Signaling) monoclonal antibody. Gel images were analyzed with ImageJ Version 1.43 (NIH) for quantification.

qPCR analysis

Populations of cells (200 cells) or single cells were sorted into lysis buffer (RNA extraction kit from Qiagen) and Reverse Transcription was done directly without mRNA extraction, according to a previously described protocol (5). qPCR experiments were carried out using the ABI7900HT system (Applied Biosystems), with the following TaqMan assays; Mm01308689 for *Tifly*, Mm00436964 for *Tgfb β 1*, Mm03024075 for *Hprt* and Mm03928990 for *18s*. A quantitative PCR method was used to measure absolute telomere length (6). *Rtll* qPCR was done using the forward primer: 5'-CAGACAAGGTCAGTTTACTCCA-3' and reverse primer: 5'-CAAGCAGCAGTTTGAGGACA-3'. *p57* with the forward primer: 5'-CAGGACGAGAATCAAGAGCA-3' and reverse primer: 5'-GCTTGGCGAAGAAGTCGT-3'. *Actin* with the forward primer: 5'-ATGGAGGGGAATACAGCCC-3' and reverse primer: 5'-TTCTTTGCAGCTCCTTCGTT-3'.

Methylation of the *Tifly* promoter

Genomic DNA (500ng) was purified from HSCs (LSK population) isolated from five 4-month-old and 20-month-old wild type mice. DNA was modified with sodium bisulfite using an EpiTect Bisulfite kit (Qiagen). Bisulfite-treated DNA (25 ng) was subsequently used as template for PCR amplification using the Pyromark PCR kit (Qiagen) prior to pyrosequencing with the following primers: Amplicon-1: 5'-GATTGAGGTGGTGAGGATAG-3' and reverse 5'-ACCCCAAAAATCTCCAAATATAAACTCCTA-3'; Amplicon-2: 5'-TGTAAGTGGTGGGGGAATTT-3' and 5'-ACCACCCCACTAAAATTATATAACTC-3'. Pyrosequencing reactions were performed in the PyroMark Q24 System (Qiagen) with the PyroGold SQA reagent kit according to the manufacturer's instructions (Pyrosequencing AB, Uppsala, Sweden) and using one sequencing primer on amplicon 1 (5'-AGGATAGTTAGTTGGTTTA-3') and three sequencing primers on amplicon 2 (5'-CTAAATCTCTATAATATAACTACTA-3', 5'-AAAAAACATACAAAAATAAAAAACC-3' and 5'-CCACCCCAAAAACCTTCACCTATC-3'). The biotinylated PCR products were purified and denatured using the Pyrosequencing Vacuum Prep Tool (Qiagen). Pyrosequencing was performed on a Pyrosequencer Q24 (Qiagen). DNA methylation level was calculated as ratio of the C to T peaks at a given CpG site in pyrograms using the Pyromark Q24 Software v.2.0.6 (Qiagen).

ChIP assay

ChIP was performed as previously described (1, 7) with antibodies against acH4K16, acH3K14, me2H3K4 and me2H3K9 (Upstate Biotechnology). qPCRs were carried out on the ABI7900HT system (Applied Biosystems), with the following primers used to amplify regions of the promoter locus of *Tifly*; (-217) 5'-GCCCTGGCATCTCTGTTTAG-3' and (-86) 5'-CACACACCCCAAAAGTCTCC-3' (Eurogentec).

Lipidomic study

Quantification of ceramides, phosphatidylcholine, lyso-phosphatidylcholine, sphingomyeline, phosphatidylserine, phosphatidylinositol, phosphatidylethanolamine and plasmalogens-phosphatidylethanolamine were performed by LC/MS/MS. Lipids were extracted from 3×10^6 lineage depleted BM cells and analyzed by mass spectrometry by the

Lipidomic Analytical Platform (Université de Bourgogne, Dijon, France). Dimyristoylphosphatidylcholine, 19:0 lyso-phosphatidylcholine, d18:1/17:0 sphingomyelin, dimyristoylphosphatidylserine, dimyristoylphosphatidyl ethanolamine and d18:1/17:0 ceramide (all purchased from Avanti Polar Lipids) were used as internal standards, and 50mg/L of butylated hydroxytoluene were added to the solvent. The chloroformic phase was evaporated and dried extracts were dissolved in 200 μ L of chloroform/methanol/water (60/30/4.5 v/v/v) and 2 to 5 μ l were further analyzed by LC/MS/MS. For ceramides, chromatography was performed on a Poroshell C8 4.6x100mm 2.7 μ m column (Agilent Technologies) installed in a 1200 HPLC (Agilent Technologies) with a binary gradient of solvent A (1mM Ammonium Formate, 0.2% formate in water) and solvent B (1mM Ammonium Formate, 0.2% Formate in methanol). Elution was performed at a flow-rate of 0.3mL/min. For the other lipids, chromatography was performed on a Zorbax Eclipse C18 2.1x100mm 1.8 μ m column (Agilent Technologies) installed in a 1200 HPLC (Agilent Technologies) with a binary gradient of solvent A (10mM Ammonium acetate, 1mM acetic acid in water/methanol 60/40 v/v) and solvent B (10mM Ammonium acetate, 1mM acetic acid in isopropanol/methanol 90/10 v/v). Elution was performed at a flow-rate of 0.25mL/min. Positive electrospray ionization mass spectrometry was performed on a triple quadrupole mass spectrometer (QQQ 6460; Agilent Technologies). Acquisition was achieved in Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode.

Simultaneous quantification of hydroxyoctadecadienoic acids (HODE), hydroxyeicosatetraenoic acids (HETE) were done by LC/MS/MS and cholesterol, 7-total hydroxycholesterols by GC/MS. Epicoprostanol (10 μ g, Sigma), 7 β -hydroxycholesterol-d7 (100ng, Avanti Polar Lipids), 13-HODE-d4 (10ng, Cayman) and 15-HETE-d7 (5ng, Cayman) were used as internal standards. HODE and HETE were quantified in MRM negative ESI mode using a triple quadrupole mass spectrometer (QQQ 6490; Agilent Technologies). Quantification of sterols was performed using a HP6890 Gas Chromatograph equipped with an HP7683 Injector and a HP5973 Mass Selective Detector (Agilent Technologies). Chromatography was performed using a HP-5MS fused silica capillary column (30m x 0.25mm inner diameter, 0.25mm film thickness, Agilent Technologies). The GC-MS conditions were as follows: carrier gas, helium at a flow-rate of 1.1mL/min; injector temperature, 250°C; oven temperature 180°C, increased at 10°C/min to 260°C, then at 1°C/min to 280°C and held for 5min. The mass spectrometer was operated under electron impact mode (70eV). The ion source and quadrupole temperatures were set at 230°C and 150°C, respectively. Data were acquired in selected ion-monitoring mode. The ions (m/z) used for the quantification of cholesterol, epicoprostanol, 7-hydroxy-cholesterols and 7 β -hydroxycholesterol-d7 were 368.3, 370.3, 456.3 and 463.3, respectively. Calibration curves were obtained from authentic standards (Avanti Polar Lipids) treated as samples.

Statistics

All data are expressed as the mean \pm SEM. Differences between two groups were assessed by Student's unpaired t test and differences between three groups by one-way ANOVA, followed by a Tukey's multiple comparison test. Statistics were performed using Prism 4 (GraphPad), significances are indicated on the figures with the following convention: *p<0.01, **p<0.001, ***p<0.0001.

Supplementary References

1. Aucagne R, *et al.* (2011) Transcription intermediary factor 1gamma is a tumor suppressor in mouse and human chronic myelomonocytic leukemia. (Translated from eng) *J Clin Invest* 121(6):2361-2370 (in eng).
2. Challen GA, Boles NC, Chambers SM, & Goodell MA (2010) Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF-beta1. (Translated from eng) *Cell Stem Cell* 6(3):265-278 (in eng).
3. Grzegorzewski K, *et al.* (1994) Recombinant transforming growth factor beta 1 and beta 2 protect mice from acutely lethal doses of 5-fluorouracil and doxorubicin. (Translated from eng) *The Journal of experimental medicine* 180(3):1047-1057 (in eng).
4. Trapnell C, *et al.* (2012) Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. (Translated from eng) *Nat Protoc* 7(3):562-578 (in eng).
5. Ramos CA, *et al.* (2006) Evidence for diversity in transcriptional profiles of single hematopoietic stem cells. (Translated from eng) *PLoS Genet* 2(9):e159 (in eng).
6. O'Callaghan NJ & Fenech M (2011) A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. (Translated from eng) *Biological procedures online* 13:3 (in eng).
7. Largeot A, *et al.* (2013) Symplekin, a polyadenylation factor, prevents MOZ and MLL activity on HOXA9 in hematopoietic cells. (Translated from Eng) *Biochim Biophys Acta* 1833(12):3054-3063 (in Eng).

Supplementary Figures

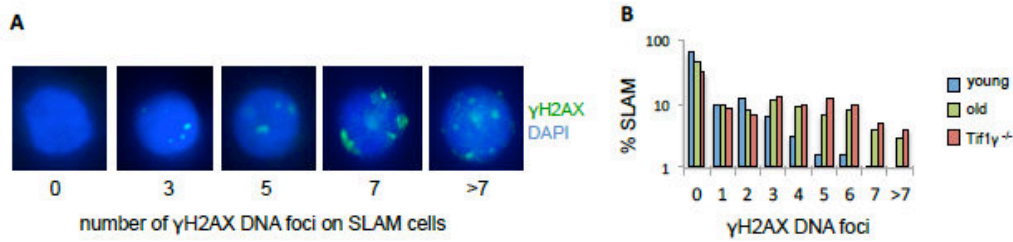


Figure S1: γ H2AX immunostaining on SLAM cells isolated from 4-month-old $Tif1\gamma^{-/-}$ mice ($Tif1\gamma^{-/-}$), 20-month-old (old) or 4-month-old (young) wild type mice. SLAM cells were directly sorted on glass slides and observed under a microscope to quantify the γ H2AX DNA foci (magnification $\times 40$). (A) Examples of SLAM cells showing different number of γ H2AX DNA foci. (B) Distribution of the SLAM. More than 100 SLAM cells were analyzed for each group. Distribution independences were evaluated by χ^2 test (young vs. old: $\chi^2 = 24.964$, $p = 0.00157$, $df = 8$; young vs. $Tif1\gamma^{-/-}$: $\chi^2 = 46.157$, $p < 0.0001$, $df = 8$; old vs. $Tif1\gamma^{-/-}$: $\chi^2 = 4.283$, $p = 0.8$, $df = 8$).

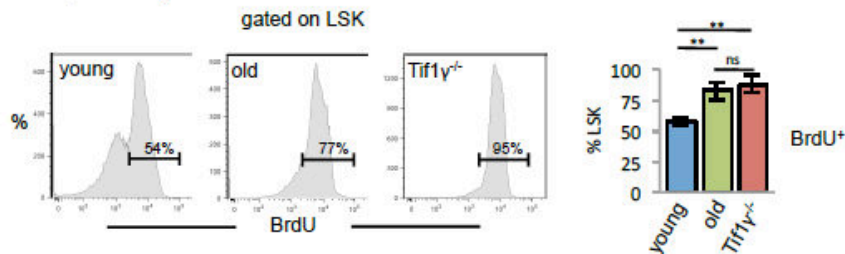


Figure S2: HSC/MPP cells (LSK gated cells) in $Tif1\gamma^{-/-}$ and old mice are more frequently in cycle. Proportions of $BrdU^+$ cells among the population of LSK cells isolated from 4-month old $Tif1\gamma^{-/-}$ mice ($Tif1\gamma^{-/-}$), 20-month-old (old) or 4-month-old (young) wild type mice. Representative FACS plots, means ($n=4$ mice) with error bars that show SEM. $**p < 0.01$.

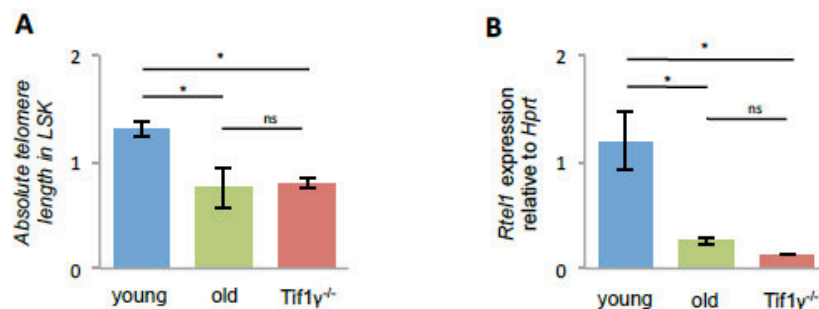


Figure S3: Telomere shortening in $Tif1\gamma^{-/-}$ LSK cells. (A) Absolute telomere length was measured by qPCR on DNA purified from LSK cells isolated from BM of 4-month-old $Tif1\gamma^{-/-}$ mice ($Tif1\gamma^{-/-}$), 20-month-old (old) or 4-month-old (young) wild type mice. (B) *Rtel1* mRNA expression measured by RT-qPCR on LSK cells. Means ($n=3$ mice) with error bars that show SEM. $*p < 0.1$.

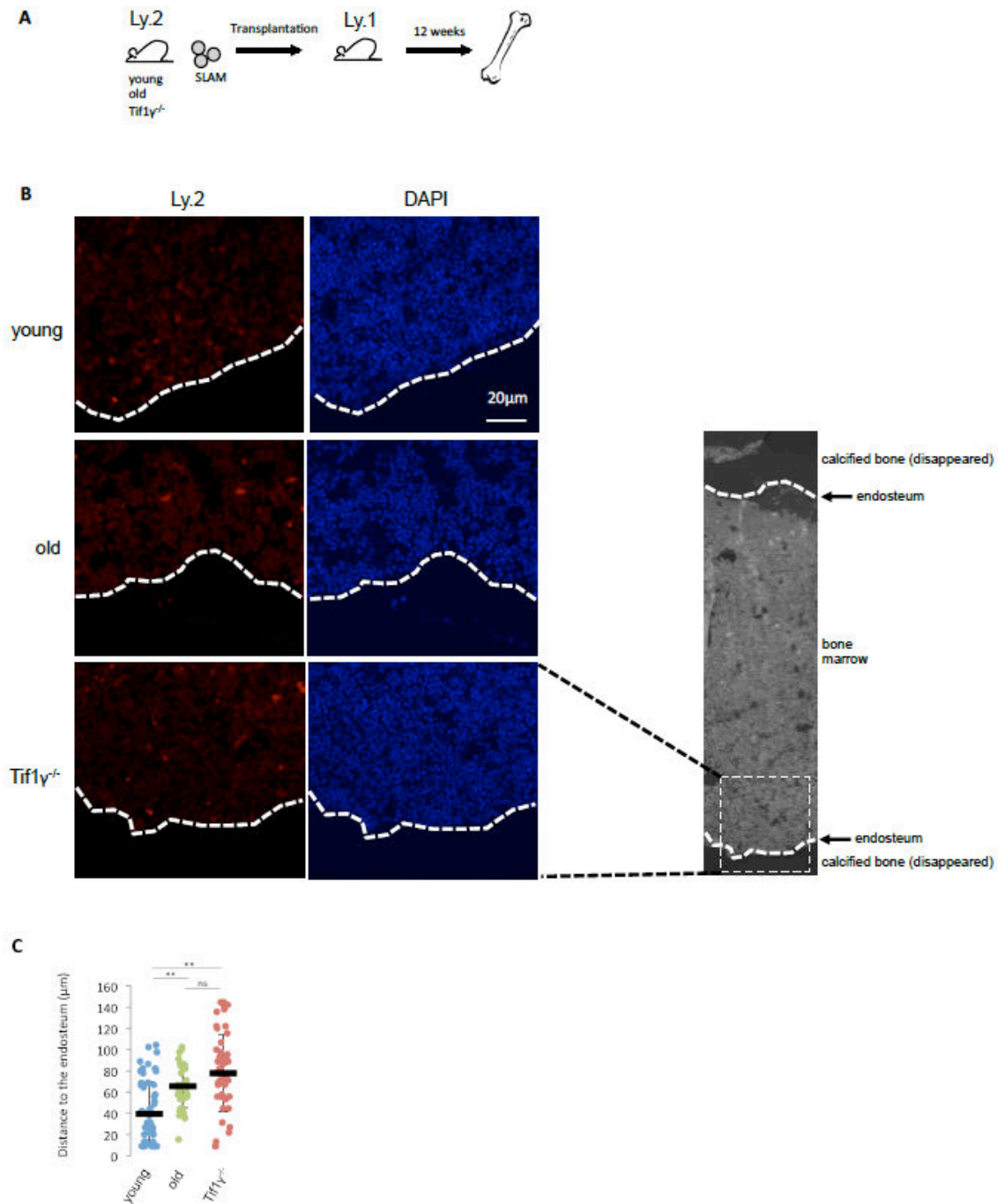


Figure S4: Tif1 $\gamma^{-/-}$ and old HSCs localized more distantly to the endosteum. (A) SLAM cells isolated from 4-month-old Tif1 $\gamma^{-/-}$ mice, 20-month-old or 4-month-old wild type Ly.2 mice were transplanted into lethally irradiated recipient Ly.1 mice. Twelve weeks after transplantation, mice were euthanized and femur fixed and decalcified. (B) Representative pictures of bone marrow sections analyzed by immunostaining with an antibody against Ly.2 to localize where young, old or Tif1 $\gamma^{-/-}$ donor hematopoietic stem cells have engrafted in bone marrow. (C) Distances to the endosteum were measured (dots) and median distances were calculated (red bars). ** $p < 0.01$.

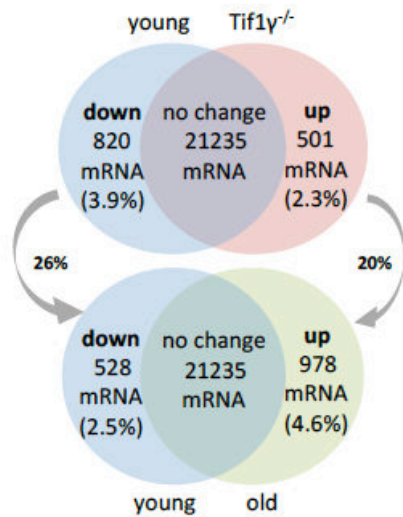


Figure S5: $Tif1\gamma^{-/-}$ hematopoietic stem cells share ~20% of their global patterns of gene expression together with the physiological aging observed in old HSCs. RNA-seq analysis performed with LSK cells (~200,000 cells) isolated and pooled from five 4-month-old $Tif1\gamma^{-/-}$ mice ($Tif1\gamma^{-/-}$), ten 4-month-old (young) and five 20-month-old (old) wild type mice. Down- and up-regulated genes were selected according to the p value; $p < 0.25$.

Table S1: List of genes deregulated in $Tif1\gamma^{-/-}$ and old libraries, compared with the young library. Data shows millions of reads.

HuGo	UCSC gene	GenBank	UniProt	gene name	Young	$Tif1\gamma^{-/-}$	Old
transcription							
Cebpa	uc009gjl.1	NM_007678	P53566	CCAAT/enhancer-binding protein alpha	33.7588	24.8005	18.2316
Sfp1	uc008kuj.1	NM_011355	Q3U514	transcription factor PU.1	100.703	77.5956	73.012
Pou2f2	uc009frp.2	NM_001163556	Q00196	POU domain, class 2, transcription factor 2	5.16871	2.52971	1.71474
Spic	uc007grv.2	NM_011461	Q6P3D7	transcription factor Spi-C	4.47017	1.65895	2.44626
Dmitf1	uc008wkv.2	NM_001110327	Q8CE22-2	cyclin-D-binding Myb-like transcription factor 1	2.10405	0.665899	0.526699
Maf	uc009nof.1	NM_001025577	P54843-2	transcription factor c-Maf	4.3824	1.22968	2.76791
Tces3	uc008vhv.2	NM_011542	P23881	transcription elongation factor A protein 3	0.397778	0.0325366	0.201363
Myd1	uc008uqo.1	NM_008506	Q3UIE0	protein L-Myc-1	1.67116	0.536536	0.799208
Tctcp21	uc007cil.1	NM_023755	Q14AW3	transcription factor CP2-like protein 1	0.222212	0.560884	0.388626
Prdm2	uc012doh.1	NM_001081355	A2A7B5	retinoblastoma protein-binding zinc finger	2.00628	5.07685	5.05155
Per2	uc007cav.1	NM_011066	Q3TN36	period circadian protein homolog 2	2.42156	3.47575	3.70495
Per3	uc012dpx.1	BC145178	A2A894	period circadian protein homolog 3	1.23631	0.29823	0.49262
Zkscan1	uc009aek.1	NM_029869	Q8BG53-2	zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 1	1.86329	0.0716962	0.666382
Zfp746	uc009btv.2	NM_001163475	Q3U133	zinc finger protein 746	7.4715	10.6615	11.1449
Zfp295	uc008adv.1	NM_175428	Q6ZPV6	zinc finger protein 295 isoform 1	1.64723	0.510092	0.534961
Phf11	uc007uee.2	NM_172603	B4XVQ1	PHD finger protein 11-like	5.01024	1.73284	2.92594
Zeb2	uc008jpe.1	NM_015753	Q6P9M5	zinc finger E-box-binding homeobox 2 isoform 2	9.05132	5.41108	6.72429
Tcf7l2	uc008hyk.2	NM_001142921	Q924A0-2	transcription factor 7-like 2 isoform 5	0	0.364264	0.337063
Taf1	uc009txy.1	BC094568	Q80UV9-2	transcription initiation factor TFIID subunit 1	0	0.430171	1.24362
Zfp473	uc009gqo.1	AK036453	Q4VA40	zinc finger protein 473 homolog	0	0.303049	0.328445
Rora	uc012gwh.1	S82720	Q3U1P4	nuclear receptor ROR-alpha	0.80342	0	0
Pflag1	uc008rwp.2	NM_019969	B1AXC4	pleiomorphic adenoma gene 1	1.49941	0.896032	0.943389
Nfic	uc007gia.1	Y07693	P70255-2	nuclear factor 1 C-type isoform a	12.8892	7.83004	7.24239
Pparg	uc009dit.2	NM_011146	Q6GU14	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	1.51169	0.0597893	0.514387
Pparg	uc009dis.2	NM_001127330	Q6GU14	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	1.92115	0.214297	0.537124
Nfat5	uc009nhl.2	NM_018823	Q9JLA1	nuclear factor of activated T-cells 5 isoform b	0.497808	1.95137	1.19333

HuGo signaling	UCSC gene	GenBank	UniProt	gene name	Young	Tif1y-/-	Old
Igf1	uc007gqw.2	NM_001111275	Q4VIC0	insulin-like growth factor I isoform 4	0.41805	0.0754495	0.179652
Ptpn1	uc0080aj.1	NM_011201	Q3TZW9	tyrosine-protein phosphatase non-receptor type	22.1888	17.3395	17.0272
Ptprv	uc007csr.2	NM_007955	Q9ERK5	receptor-type tyrosine-protein phosphatase V	3.37935	1.77428	1.65522
HGFR	uc009azr.1	NM_008591	A4FUV7	hepatocyte growth factor receptor	1.48771	0.470638	0.792831
Sirpb1a	uc0080qw.1	NM_001002898	Q3U390	signal-regulatory protein beta 1	11.0646	0.746836	4.38586
Sirpb1b	uc0080ra.1	NM_001173460	Q6F5F2	signal-regulatory protein beta 1B	8.03171	0.736461	3.65536
Shootin1	uc008lbe.1	NM_001114312	Q8K2Q9	shootin-1 isoform 1	2.70242	0.70402	1.59558
Plk3ap1	uc008hlu.1	NM_031376	Q9EQ32	phosphoinositide 3-kinase adapter protein 1	20.1597	11.6338	11.687
Gngt2	uc007lav.1	NM_001038664	A2A614	guanine nucleotide-binding protein	32.462	16.0753	18.8265
Mapkapk2	uc007cmv.1	NM_008551	Q3U2P8	MAP kinase-activated protein kinase 2	91.6089	68.6912	74.1532
Card9	uc008lut.1	NM_001037747	A2AIV8	caspase recruitment domain-containing protein 9	14.9439	9.04135	11.0235
Rab7b	uc007cnp.1	NM_145509	Q8VEA8	ras-related protein Rab-7b	1.9916	0.855038	0.635169
Rab39	uc009pmm.1	NM_175562	Q0PD15	ras-related protein Rab-39A	0.624041	0.226394	0.210603
Rab44	uc008bsi.1	NM_001002786	Q8CB87	ras-related protein Rab-44	31.3542	19.2965	23.3344
Rassf4	uc009dkm.2	NM_178045	Q8CB96	ras association domain-containing protein 4	14.3711	7.62839	9.28051
Rasgrp4	uc012fha.1	NM_001174155	Q8B7M9-2	ras guanyl-releasing protein 4 isoform 1	0	0.25036	1.30421
Arhgef10f	uc008vmx.2	NM_001112723	A2AWP8-3	rho guanine nucleotide exchange factor 10-like	2.74181	1.01706	1.41293
Arhgef12	uc009pbb.1	AF467766	Q8RH42	rho guanine nucleotide exchange factor 12	2.30854	0.324939	0.758503
P2ry10	uc009uby.1	AK020001	Q8BFU7	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 10	5.11231	7.42286	9.13099
Gpr114	uc009mxk.2	AK156609	AGH6A1	G protein-coupled receptor 114	0.248587	0	0
Gpr137b	uc007pmc.1	AK147921	Q3UGH7	G protein-coupled receptor 137B	0.290882	0	0
Gpr126	uc007elk.1	NM_001002268	Q6F3F9	G-protein coupled receptor 126 precursor	0.150694	0.0741584	0.0712435
Htr7	uc008hhd.1	NM_008315	Q1AA50	5-hydroxytryptamine receptor 7	0.243415	0	0
Ptafr	uc008vbn.1	NM_001081211	Q62035	platelet-activating factor receptor	7.34335	3.75707	3.9955
Gria3	uc009tal.2	AK220530	A2VDF4	glutamate receptor 3 precursor	4.24533	2.8144	2.72056
Inpp5a	uc009kfs.2	AK157558	Q3TZT4	inositol polyphosphate-5-phosphatase A isoform	0	1.68185	1.91907
Zfyve9	uc008ubn.1	NM_183300	A0S860	zinc finger FYVE domain-containing protein 9	1.46074	0.296675	0.690828
Kidins220	uc007nfb.2	BC157898	B2RXL7	kinase D-interacting substrate of 220 kDa	1.26229	3.68622	3.49696
Birc6	uc008doe.1	NM_007566	O88738	baculoviral IAP repeat-containing 6	4.1876	7.91228	6.00076
Sla	uc011ztn.1	AK037901	Q4FIX0	src-like-adapter isoform b	0	1.1988	1.18166
Fibp	uc008gdl.1	AK086610		aFGF intracellular binding protein	0.649438	0	0

RNA processing

Apobec1	uc009dpk.1	NM_031159	Q3U9G8	C-U-editing enzyme APOBEC-1 isoform 1	20	8.24422	14.9914
Ddx55	uc012edn.1	NM_001190795	Q810A4	ATP-dependent RNA helicase DDX55 isoform 2	0	0.3439	0.256326
Rbfox2	uc007wne.2	NM_001110829	Q8BP71-8	RNA-binding protein 9 isoform 5	0.153871	0	0
Rnpc3	uc008rbf.1	AK161063	Q3UZ01-2	RNA-binding protein 40	0	0.89336	0.349489
Endou	uc007xkx.1	AK169457	Q3V188-2	poly(U)-specific endoribonuclease isoform 2	0	0.34736	0.483946
Rbfox2	uc007wnh.2	NM_175387	Q8BP71-5	RNA-binding protein 9 isoform 2	0.173359	0	0
Adarb1	uc007fvf.2	AY162454	Q91ZS8-3	RNA-editing deaminase 1	0	0.151335	0.184828

inflammatory response

Ifitm3	uc009kjc.1	NM_025378	Q9CQW9	interferon-induced transmembrane protein 3	363.287	253.333	259.523
Ifitm1	uc009kja.2	NM_026820	D3YX42	interferon-induced transmembrane protein 1	346.94	227.849	248.341
Ifit2	uc008hgn.2	NM_008332	Q6GTM0	interferon-induced protein t2	10.4932	6.54116	7.35656
Ciita	uc007ydt.1	AK138822	P79621	MHC class II transactivator	2.16172	0.361891	0.639252
Ifi204	uc007drv.1	NM_008329	Q08619	interferon-activable protein 204	12.3125	4.13344	6.87035
Ilgp1	uc008fac.2	NM_021792	Q9QZ85	interferon-inducible GTPase 1	10.0563	7.18238	5.62521
Pyhin1	uc007drr.2	NM_175026	Q504N7-2	pyrin and HIN domain-containing protein 1	11.0315	4.45142	7.07195
Ifih1	uc008jvm.2	NM_027835	D2CGM4	interferon-induced helicase C domain-containing	8.42079	5.75207	5.66376
Irf1	uc007iwx.2	AY225160	Q55X13	interferon regulatory factor 1 isoform a	0.935734	0	0
Irf7	uc009kkg.1	NM_016850	Q542T3	interferon regulatory factor 7	12.8912	6.97998	6.19267
Irf8	uc009nrk.1	NM_008320	Q544J7	interferon regulatory factor 8	45.9728	27.1084	32.6837
Sh2d1b1	uc007dmc.1	NM_012009	Q149T1	SH2 domain-containing protein 1B	4.51506	1.30716	1.89173
Ifi2712a	uc007ovu.2	NM_029803	Q8R412	interferon, alpha-inducible protein 27 like 2A	82.5343	24.7395	33.0543
Pydc3	uc007drt.1	NM_001162938	D3Z5G0	interferon-activable protein 204-like	3.20569	1.88389	1.46483
Mx1	uc008adh.1	NR_003520	Q3UD61	interferon-induced GTP-binding protein Mx1	2.52694	0.724395	1.1069
Oas1g	uc008zif.1	NM_011852	Q8K469	2'-5' oligoadenylate synthetase 1G	5.74528	2.57408	1.2941
Oas12	uc008zcu.1	NM_011854	Q9D6S2	54 kDa 2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	22.3384	16.5566	11.3579
Cfh	uc007cwt.1	AK087707	Q6NZK3	complement factor H	0	0.155902	0.434698
Tnfrsf11a	uc007cgp.1	NM_009399	Q35305	tumor necrosis factor receptor superfamily	0.793279	0.35509	0.397292
Uaca	uc009pzi.1	NM_028283	Q8CGB3-3	uveal autoantigen with coiled-coil domains	0.136044	1.37932	1.0964
Tnfrsf1b	uc008vrt.1	NM_011610	Q545P4	tumor necrosis factor receptor superfamily	22.553	12.7404	15.4441
Il10ra	uc009pfn.1	NM_008348	Q3UDL4	interleukin-10 receptor subunit alpha precursor	17.8556	8.52939	8.89334
Cd300lb	uc007mga.1	NM_199221	Q3U497	CMRF35-like molecule 7	3.34748	1.19651	1.83726
Tnfrsf25	uc008vzk.1	NM_033042	Q8VD70	tumor necrosis factor receptor superfamily	0.0535175	0.211019	0.189173

HuGo	UCSC gene	GenBank	UniProt	gene name	Young	Tif1y-/-	Old
chemotaxis							
Ccr3	uc009sha.2	NM_009914	Q8K3M7	C-C chemokine receptor type 3	0.639367	0.117129	0.18054
Ccr9	uc009sgl.2	AK019478	Q9WU77	C-C chemokine receptor type 9	1.92397	4.92833	3.5705
Ccl9	uc007kpl.1	NM_011338	Q3U9T8	C-C motif chemokine 9	46.1608	26.3826	22.1538
Tnfrsf11	uc007ush.1	NM_011613	Q3TWY5	tumor necrosis factor ligand superfamily member	0.212825	0.460392	0.52471
Xcr1	uc009sgw.1	NM_011798	Q544D8	chemokine XC receptor 1	2.19268	0.573844	1.1005
Defb14	uc009lal.2	NM_183026	Q7TNV9	beta-defensin 14 precursor	0.264207	0	0
antigen processing							
Fcgr3	uc011vww.1	NM_010188	P08101-2	low affinity immunoglobulin gamma Fc region	20.1077	6.69179	14.3789
Trem14	uc008cxa.1	NM_172623	Q3LRV9	triggering receptor expressed on myeloid	4.06336	0.695517	0.760589
Ulrp4	uc007fam.1	AK167751	Q64281	leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 4 (CD85k)	5.36793	0.75906	1.22211
Skap1	uc007kcf.2	NM_001033186	A2A881	src kinase-associated phosphoprotein 1 isoform	0	0.161195	0.158174
regulation of immune response							
Thmbx2	uc008vbw.1	NM_001033308	Q91YX0	thymocyte selection associated family member 2	19.4694	9.14363	12.7676
Cd5l	uc008psa.2	NM_009690	Q3TXN5	CD5 antigen-like precursor	0.963842	0.160616	0.471829
Ms4a2	uc008gsn.1	NM_013516	B2RTF7	high affinity immunoglobulin epsilon receptor	4.66095	2.32491	2.38357
Lst1	uc008cgn.1	NM_010734	O08843-2	leukocyte-specific transcript 1 protein	104.824	50.4078	54.5421
Cd86	uc007zcg.2	NM_019388	Q549Q9	CD86 precursor	3.83494	2.28301	1.87168
innate immune response							
Dhx58	uc007lix.1	NM_030150	A2ASE9	probable ATP-dependent RNA helicase DHX58	16.266	11.4686	9.60072
Sh2d1a	uc009tbb.1	NM_011364	Q544F1	SH2 domain-containing protein 1A	0	0.449091	0.425747
Fcna	uc008isz.1	NM_007995	Q4FJM1	ficollin-1 precursor	2.00919	0.363202	0.613431
cytokine signaling							
Tyrobp	uc009gef.1	NM_011662	Q3U419	TYRO protein tyrosine kinase-binding protein	185.083	84.7598	129.602
Il6ra	uc008qag.1	AK141197	Q3URV7	interleukin-6 receptor subunit alpha precursor	9.24912	5.46219	6.09358
Il2rb	uc007wpk.2	NM_008368	P16297	interleukin-2 receptor subunit beta precursor	1.03901	1.85786	3.92727
Csf2rb2	uc007woy.1	NM_007781	Q8QZX9	colony stimulating factor 2 receptor, beta 2	5.1756	2.33057	2.82896
Csf2rb	uc007wpa.2	NM_007780	Q3U241	colony stimulating factor 2 receptor, beta	16.9516	8.62495	11.8721
Flt1	uc009aoh.1	NM_010228	P35969	FMS-like tyrosine kinase 1	0.359619	0.0679706	0.175095
Cd83	uc007qgk.2	NM_009856	O88324	CD83 antigen precursor	2.80506	0.37969	0.810019
cell adhesion / migration							
Eda	uc009tvs.1	NM_001177939	A2ADU3	ectodysplasin-A isoform 4	0	0.2089	0.175568
Ephb2	uc008vin.1	BC062924	A3KG02	ephrin type-B receptor 2	0	0.238587	0.390387
Cgref1	uc008wwo.1	NM_026770	Q8R1U2	cell growth regulator with EF hand domain	0.173011	0	0
Cbl11	uc007nhw.1	AK166017	Q9IIY2-4	Casitas B-lineage lymphoma-like 1	0	0.88533	1.07475
Eda	uc009twv.1	NM_001177940	Q1L2D9	ectodysplasin-A isoform 5	0.313244	0	0
Adamts10	uc012apf.1	NR_037708	P58459	disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 10	0.664393	0	0
Dgcr2	uc007ymi.2	NM_001109750	Q3TQ62	integral membrane protein DGCR2/IDD isoform 2	2.56491	9.43841	7.25267
Ctnd1	uc008kis.1	NM_001085449	D3Z7H6	catenin delta-1 isoform 3	7.3528	4.58037	4.27851
Siglec1	uc008mko.1	NM_011426	D3YVZ3	sialoadhesin	1.74212	0.0733117	0.326819
Ibsp	uc008ykg.2	NM_008318	Q80VR6	integrin-binding sialoprotein 2	1.65396	0.313895	0.987535
Cadm1	uc009pfp.1	NM_207675	Q8R5M8	cell adhesion molecule 1 isoform a	0.334004	0	0
Sparc	uc007tzi.2	AK148670	Q5NCL4	SPARC precursor	1.45454	0.182149	0.00621353
Ofim1	uc008hyb.1	NM_001038613	A3KGE4	noelin isoform c	3.45486	0.889493	1.77174
Klre1	uc009egb.1	NM_153590	Q8CIC7	killer cell lectin-like receptor family E member	0	0.206912	0.32187
cell cycle							
Cdk10	uc009nun.2	NM_194446	Q3UMM4	cell division protein kinase 10 isoform 1	9.54121	14.4186	14.1354
Ccnc	uc008scw.2	AK014079	Q0P542	cyclin C	0	0.516931	0.356373
Mki67	uc009kem.2	NM_001081117	Q61769	antigen Ki-67	33.3884	42.6991	42.2317
Prc1	uc009iah.2	NM_145150	Q99K43	protein regulator of cytokinesis 1	5.34439	8.39065	8.57903
Wac	uc008ead.2	NM_153085	Q924H7	WW domain-containing adapter protein with coiled-coil	10.2002	14.9648	14.5366
Fhl1	uc009tgo.1	NM_001077362	A2AEX8	four and a half LIM domains protein 1 isoform 2	0	0.76211	0.438677
Ect2	uc008otj.2	L11316	Q3TZP2	Ect2 oncogene	0	0.707193	0.216719
Setdb2	uc011zms.1	EU155098	B4XVP0	histone-lysine N-methyltransferase SETDB2	0	0.570826	0.698091
Ppp2r5e	uc007mxf.1	AK133824	Q3UZJ4	serine/threonine-protein phosphatase 2A	0	0.72288	0.250582
Amn1	uc009eua.1	AK050169	B8JKU8	antagonist of mitotic exit network 1	0	0.436279	0.795853
cytoskeleton							
Myo1f	uc008byu.2	NM_053214	Q8CG29	myosin-1f	29.8373	20.0524	21.1207
Myo1g	uc007hyt.2	NM_178440	Q55UA5	myosin-1g	41.9016	34.4659	30.2336
Myo9a	uc009pyq.2	NM_173018	D3Z3A8	myosin-IXa	0	0.228428	0.466396
Eps8	uc009enb.1	BC016890	Q3TM41	epidermal growth factor receptor kinase	4.72002	3.07155	2.8984
Fkbp15	uc012dfq.1	BC137706	B2RQ18	FK506-binding protein 15	2.10882	0.788186	0.821489
Mical3	uc009dzn.2	NM_153396	B2RR77	protein MICAL-3	0.186006	0	0
Bcl6	uc007ytz.1	NM_009744	Q544F9	B-cell lymphoma 6 protein homolog	6.69374	3.4576	4.56666
Marcks	uc007evg.1	NM_008538	P26645	myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	22.307	11.567	13.8388
Fyb	uc007vdj.1	NM_011815	B2RUR0	FYN-binding protein	19.5277	8.31587	11.4659
Krt80	uc007xta.1	AK004811	Q0VBK2	keratin, type II cytoskeletal 80	5.3328	1.91057	2.30133
Cttnb2	uc008quv.2	NM_001163332	Q99LJ0	CTNBP2 N-terminal-like protein	1.2534	0.276042	0.599944
Frmf4b	uc009dau.1	AK129262	Q6ZQ04	FERM domain-containing protein 4B	3.30727	1.87652	1.87972
Mtap7d1	uc008uta.2	NM_001145970	A2AJI1	MAP7 domain-containing protein 1 isoform 2	2.47319	5.68342	7.00447
Bicd1	uc009euh.2	NM_009753	B2K644	protein bicaudal D homolog 1 isoform 2	0	0.223395	0.377147
Plxna3	uc012hku.1	BC093482	AS06Q5	plexin A3	0	0.216315	0.162273
Dnal1	uc007oek.2	AK005826	Q05A62-3	dynein light chain 1, axonemal	0.15826	0	0

HuGo	UCSC gene	GenBank	UniProt	gene name	Young	Tif1y-/-	Old
chromosome structure							
Ctc1	uc007joz.2	NM_001143790	Q5SUQ9-2	CST complex subunit CTC1 isoform c	1.64372	5.5125	4.8522
Rtel1	uc008olv.2	NM_001001882	Q0VGM9-2	regulator of telomere elongation helicase 1	1.66829	0.187901	0.12993
Cspp1	uc007ahh.1	BC019581	Q9CQD5	centrosome and spindle pole associated protein 1	0	0.509025	0.473457
Cep250	uc012chj.1	NM_001129999	A3KGJ7	centrosome-associated protein CEP250 isoform 2	0.555635	0	0
Wdr62	uc009gdx.2	NM_146186	Q3U3T8	WD repeat-containing protein 62	1.22897	0.265974	0.131189
Cep571	uc007eya.1	AK012710	Q8VDS7-1	cep57-related protein isoform 1	5.36364	2.84733	3.00593
Kif1c	uc007jwm.1	AK173007	Q6A011	kinesin-like protein KIF1C	0.295904	0	0
Dclk2	uc008pro.3	NM_001195496	Q6PGN3-3	serine/threonine-protein kinase DCLK2 isoform 1	0	0.559121	0.479488
Pogz	uc008qhd.2	NM_001165948	Q0VGT3	pogo transposable element with ZNF domain	1.5064	0.67958	0.628948
catabolism							
Mcpt8	uc007ubm.1	NM_008572	Q3UWB6	mast cell protease 8 precursor	56.1889	22.8608	24.1858
Gbg	uc008cdy.2	NM_008198	B8JIM5	Glycine-rich beta glycoprotein	2.20101	0.39928	1.3155
Anpep	uc009hxd.1	NM_008486	P97449	aminopeptidase N	2.1919	0.87397	1.30419
Amz1	uc009aif.1	NM_173405	A1L312	archaemetzincin-1	3.05773	1.13123	1.56255
Pla2g12a	uc008rip.2	NM_183423	Q9EPR2-2	group XIIA secretory phospholipase A2 isoform 2	0.571654	0	0
Smpd13b	uc008vbs.1	NM_133888	Q3TLX9	acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3b	1.70969	0.317467	0.795143
Lpl	uc009lwg.1	NM_008509	Q542L4	lipoprotein lipase precursor	6.44432	1.7757	3.97609
Srd5a1	uc007rc1.1	BC115469	Q8BUR8	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 1	0.638862	0	0
proteasome complex							
Rnf111	uc009qob.1	BC069835	Q99ML9-2	E3 ubiquitin-protein ligase Arkadia	2.81953	4.63337	5.00516
Trim68	uc009isf.2	NM_198012	Q8K243	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM68	1.8236	5.40946	5.80774
Neur13	uc007aps.1	NM_153408	Q8CJCS	E3 ubiquitin-protein ligase NEURL3	34.1105	27.1638	24.3896
Trim68	uc009isg.2	AK164544	Q8K243	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM68	4.84982	1.58497	1.51653
March1	uc009lvm.2	NM_001166375	Q6NZQ8-4	E3 ubiquitin-protein ligase MARCH1 isoform 2	1.91847	0.290214	0.4822
Ubd	uc008cmi.2	NM_023137	P63072	ubiquitin D	0.82094	0.2234	0.423304
Uba3	uc009dan.2	BC080776	Q66IT6	NEDD8-activating enzyme E1 catalytic subunit	0	1.14022	0.618934
Lnx1	uc008xts.2	NM_001159579	A4QPD4	ligand of numb-protein X 1	0.354812	0	0
Ndfip2	uc007uxp.2	AK084288	Q91ZP6-2	NEDD4 family-interacting protein 2	0.323748	0	0
Dnajb2	uc007bop.2	NM_020266	Q9QYI5-2	dnaJ homolog subfamily B member 2 isoform 1	0.784542	0	0
metabolism							
Cox6a2	uc009jyl.1	NM_009943	P43023	cytochrome c oxidase subunit 6A2, mitochondrial	5.35823	13.8872	13.4455
Pfkfb4	uc009rr1.1	NM_173019	Q6D7Y7	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,	6.08433	2.61079	3.83072
Mthfr	uc008vtx.2	NM_001161798	AZA7F7	methylene tetrahydrofolate reductase isoform a	2.69459	1.16179	1.12385
Serpina3g	uc007oxa.1	BC002065	Q5I2A0	serine protease inhibitor A3G	106.774	73.2989	66.1713
Smox	uc008mlm.2	NM_145533	Q3UPW5	spermine oxidase isoform b	2.71941	4.92916	4.92351
Dse	uc007eus.1	NM_172508	Q8BLI4	dermatan-sulfate epimerase precursor	2.78561	0.62101	1.34974
Papss2	uc008hfl.2	NM_001201470	Q5BKPA	bifunctional 3'-phosphoadenosine	1.44143	0.649921	0.670648
Hsd17b1	uc007lnb.1	NM_010475	Q790P4	estradiol 17-beta-dehydrogenase 1	1.27392	0.545929	0.599796
Sqle	uc007vvr.1	AK161837	Q3T557	squalene monooxygenase	0	0.568827	0.578333
Xylb	uc009sav.2	AK170197	Q66IV3	xylulose kinase isoform 2	0	0.193403	0.315093
Pfkfb4	uc012haz.1	A1707862	C9VZF2	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase 4	0	0.475356	0.746617
L3hpdh	uc007nve.1	AK137154	Q9CA22	L-3-hydroxyproline dehydratase (trans-)	0.292332	0	0
Pfkfb4	uc009rrk.1	BC057594	Q6D7Y7-5	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,	0.398087	0	0
Chst10	uc011wjt.1	AK050676	A2R5S2	carbohydrate sulfotransferase 10	0.639542	0	0
Gls2	uc007hlo.2	NM_001033264	Q571F8	glutaminase liver isoform, mitochondrial	0	0.171767	0.267695
lysosome							
Nbr1	uc007ipj.1	AK129043	AZA4N5	neighbor of Brca1 gene 1	2.15366	5.52698	5.04707
Hexa	uc009pxw.1	NM_010421	Q91XG3	beta-hexosaminidase subunit alpha precursor	57.7946	45.1963	46.2271
Lipa	uc008hgm.2	NM_001111100	Q8C2G7	lysosomal acid lipase/cholesteryl ester	25.8146	19.3052	17.9397
Psap	uc007feq.1	NM_001146124	Q8BFQ1	prosapin	280.832	122.817	193.981
Gns	uc007hfo.1	NM_029364	Q8BFR4	N-acetylglucosamine-6-sulfatase precursor	18.8681	15.0021	13.4741
CtsG	uc007ubn.1	NM_007800	Q059V7	cathepsin G preproprotein	155.485	83.6887	113.198
CtsE	uc007cnn.2	NM_007799	Q3UKT5	cathepsin E preproprotein	45.8284	5.24135	18.2167
CtsW	uc008gdk.2	NM_009985	Q8C2M0	cathepsin W preproprotein	7.08885	11.0101	10.7967
CtsA	uc008nwl.1	NM_008906	Q544R6	lysosomal protective protein isoform a	24.6959	14.4086	17.3894
CtsC	uc009ifu.2	NM_009982	Q3UBY5	cathepsin C	39.5844	21.61	28.2771
Cd209f	uc009ksy.2	NM_026956	Q14FK5	CD209f antigen	0.319531	0.0402591	0.0409633
Mpo	uc011ycc.1	NM_010824	Q5NCP1	myeloperoxidase precursor	478.233	254.232	318.59
Ncf2	uc007czm.1	NM_010877	O70145	neutrophil cytosol factor 2	31.2845	24.8091	25.1734
endocytosis / trafficking							
Fcgr3	uc007dmy.2	AK163401	P08101-2	low affinity immunoglobulin gamma Fc region	0	3.41242	0.59367
Idlr	uc009omj.1	AK166466	Q6GTJ9	low-density lipoprotein receptor	0.499263	1.34974	3.03119
Lrp8	uc008uag.1	AK038580	B1AXJ7	low-density lipoprotein receptor-related protein	2.63922	3.76612	3.80247
Cd300a	uc007mfy.1	NM_170758	Q65JQ0	CMRF35-like molecule 8	10.4436	4.46349	4.34077
Zdhhc2	uc009lmo.1	NM_178395	P59267	palmitoyltransferase ZDHHC2	0	0.28266	0.395543
Cd300lg	uc007lqh.2	NM_001160712	Q1ERP8	CMRF35-like molecule 9 isoform 3	0.20519	0	0
Tom1l1	uc007kxb.1	NM_028011	Q8BZR6	TOM1-like protein 1	0	0.278507	0.285775
Slc35c2	uc008nkh.1	AK053180	Q3U226	solute carrier family 35, member C2	1.65674	5.51074	4.78505
Trappc2	uc009uwt.1	AK007951	AZAFP1	trafficking protein particle complex 2	0	1.71552	1.67761
Trak1	uc009sdf.1	NM_175114	Q6PD31	trafficking kinesin-binding protein 1	0	0.482259	0.699713
Snx13	uc011yjl.1	AK164161	Q6PHS6	sorting nexin-13	0	0.389771	0.67473

HuGo	UCSC gene	GenBank	UniProt	gene name	Young	Tif1y-/-	Old
endocytosis / trafficking							
Fcgr3	uc007dmy.2	AK163401	P08101-2	low affinity immunoglobulin gamma Fc region	0	3.41242	0.59367
Ldlr	uc009omj.1	AK166466	Q6GTJ9	low-density lipoprotein receptor	0.499263	1.34974	3.03119
Lrp8	uc008uag.1	AK038580	B1AXU7	low-density lipoprotein receptor-related protein	2.63922	3.76612	3.80247
Cd300a	uc007mfy.1	NM_170758	Q6SJQ0	CMRF35-like molecule 8	10.4436	4.46349	4.34077
Zdhhc2	uc009lmo.1	NM_178395	P59267	palmitoyltransferase ZDHHC2	0	0.28266	0.395543
Cd300g	uc007lqh.2	NM_001160712	Q1ERP8	CMRF35-like molecule 9 isoform 3	0.20519	0	0
Tom1l1	uc007kxb.1	NM_028011	Q8BZR6	TOM1-like protein 1	0	0.278507	0.285775
Slc35c2	uc008nxh.1	AK053180	Q3U226	solute carrier family 35, member C2	1.65674	5.51074	4.78505
Trapp2	uc009uwt.1	AK007951	A2AFP1	trafficking protein particle complex 2	0	1.71552	1.67761
Trak1	uc009sdf.1	NM_175114	Q6PD31	trafficking kinesin-binding protein 1	0	0.482259	0.699713
Snx13	uc011ylj.1	AK164161	Q6PHS6	sorting nexin-13	0	0.389771	0.67473
transport							
Hfe	uc007pup.1	NM_010424	Q9D754	hereditary hemochromatosis protein homolog	10.5974	3.24243	4.95973
Rhd	uc008vfu.1	AK166030	Q9QWK3	blood group Rh(D) polypeptide	0	0.337889	0.844082
Atp2b1	uc007gxf.2	NM_026482	Q8K314	plasma membrane calcium ATPase 1	11.1006	8.59634	8.75593
Atp8b4	uc008mdn.2	NM_001080944	A2ANX3	ATPase, class I, type 8B, member 4	11.4562	7.47169	7.40255
Atp1a3	uc009frf.1	BC042894	Q6PIC6	sodium/potassium-transporting ATPase subunit	11.1218	5.04991	6.89895
Slc4a7	uc007sgp.1	NM_001033270	D3Y272	sodium bicarbonate cotransporter 3	4.57849	0.529194	0.0559043
Trf	uc009qrg.1	AK142599	Q92111	serotransferrin precursor	50.506	39.7112	36.1873
Cnnm3	uc007aqk.1	BC052714	Q32NY4	cyclin M3	3.41521	1.51939	0.969341
Kctd18	uc011whl.1	NR_027630	E0CXJ5	potassium channel tetramerisation domain containing 18	0	0.379967	0.401848
Itrp2	uc009erw.1	NM_019923	B2KFP1	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2	0.839769	1.62762	1.84479
Slc22a21	uc011xut.1	AK080177	A2RSK7	Solute carrier family 22 (Organic cation transporter), member 21	1.53641	0.651499	0.599
Slc24a6	uc012eco.1	NM_001177594	Q925Q3-3	sodium/potassium/calcium exchanger 6 isoform 2	0	0.332647	0.754399
Slc25a14	uc009tco.2	NM_011398	A2AF76	brain mitochondrial carrier protein 1 isoform 2	0	0.267376	0.190888
Sifn5	uc007kzn.2	NM_183201	Q8CBA2	schlafen family member 5	7.22437	3.33609	4.18774
P2rx7	uc008zsq.1	NM_011027	Q8CHP4	P2X purinoceptor 7	2.53363	1.60519	1.69518
Abcg3	uc008ykt.1	NM_030239	Q8BK15	ATP-binding cassette sub-family G member 3	4.37828	1.2811	2.34328
Abcd2	uc007xhk.1	NM_011994	Q61285	ATP-binding cassette sub-family D member 2	3.74111	1.7771	2.36566
Pltp	uc008nwn.1	NM_011125	Q3UF55	phospholipid transfer protein precursor	16.5564	1.86958	7.40362
Plin2	uc008tlz.1	NM_007408	Q8K3Q8	perilipin-2	25.3764	19.7353	18.3887
Plekho2	uc009qdn.1	NM_153119	Q8K124	pleckstrin homology domain-containing family O	36.4474	29.027	28.8627
Atp9a	uc008obc.1	NM_015731	A2AQC3	phospholipid-transporting ATPase IIA	0	0.355714	1.24261
Mif4gd	uc007mie.2	BC026745	Q3UBZ5-2	RecName: Full=MIF4G domain-containing protein;	1.09778	0	0
Eif2b3	uc008uhv.2	AK172173	A0AUM9	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 3	0	2.37544	0.851066
unclassified							
Jhdm1d	uc009bjl.2	NM_001033430	Q3UWM4	lysine-specific demethylase 7	6.55398	4.54917	5.05681
Dnajb2	uc007bon.2	NM_001159883	Q3TB24	dnaJ homolog subfamily B member 2 isoform 3	1.11826	2.53006	3.89587
GRP78	uc008jit.2	NM_022310	A2AUF6	78 kDa glucose-regulated protein precursor	138.745	178.376	223.59
St6galnac4	uc008jfy.1	Y15779	Q8CJ32	alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,	14.024	10.379	10.6901
Sgk1	uc011xhb.1	NM_001161849	Q9WVCG-3	serine/threonine-protein kinase Sgk1 isoform c	0.29422	0	0
Fbxo21	uc008zga.1	NM_145564	Q8VDH1	F-box only protein 21	4.48757	1.58229	2.47289
Slx4	uc007xgz.1	NM_177472	Q6P1D7	structure-specific endonuclease subunit SLX4	1.42598	0.436908	0.63541
Ear6	uc007tnf.1	NM_053111	Q923L7	eosinophil-associated, ribonuclease A family,	1.04241	0.0985032	0.1445
Pcp2	uc009ksd.2	BC028982	A8IK50	purkinje cell protein 2	0.55384	0	0
Fcer2a	uc012fyq.1	AY069980	Q8VH33	low affinity immunoglobulin epsilon Fc receptor	0.195768	0	0
B4galnt4	uc012fwn.1	BC062653	Q766D5	N-acetyl-beta-glucosaminyl-glycoprotein	0	0.268459	0.324731
Sco1	uc007jlv.1	AK011251	AK011251	SCO cytochrome oxidase deficient homolog 1	0.190835	0	0
Gimap4	uc009bvk.1	NM_174990	D3YTN4	GTPase IMAP family member 4 isoform a	3.4256	5.70733	8.81559
Trim30a	uc009lwh.1	NM_009099	Q3UV85	tripartite motif-containing protein 30	24.4405	14.7184	10.2225
Klrl1	uc009egg.1	NM_001083322	Q4FJM0	NKG2-D type II integral membrane protein isoform	1.49421	0.474539	0.654158
Rsad2	uc007nfh.2	NM_021384	Q8CB99	radical S-adenosyl methionine domain-containing	6.47079	3.38688	3.20893
Ptxdc2	uc008lkz.1	NM_026162	B1AY84	plexin domain-containing protein 2 precursor	3.08769	1.68115	1.57933
Gm11428	uc007kpg.1	NM_001081957	Q5SSJ1	activated macrophage/microglia WAP domain	71.9927	47.3509	45.6922
Myadm	uc009eup.1	NM_001093764	Q0VE46	myeloid-associated differentiation marker	17.129	12.3921	12.5942
Agfg1	uc007bse.1	NM_010472	Q8K2K6-1	arf-GAP domain and FG repeats-containing protein	2.24287	6.87525	7.22484
Dab2ip	uc008jks.2	NM_001114124	Q3UHC7	disabled homolog 2-interacting protein isoform	2.01293	0.933104	1.04238
Serpina3h	uc007obx.2	NR_033450	D3YWQ4	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3H	3.79006	2.45608	2.34052
Trim33	uc008qsw.1	NM_001079830	E9QME5	transcriptional intermediary factor 1 gamma	3.08306	1.45283	2.26239
BC055004	uc012efk.1	NM_001013773	E0CYW5	hypothetical protein LOC381680	2.10394	0.588563	0.49154
Cd300lb	uc007mgb.1	BC107352	Q3TEQ8	SubName: Full=Putative uncharacterized protein;	3.54047	1.46019	2.14077
Pydc4	uc007drq.2	NM_001177349	Q3UPZ5	hypothetical protein LOC623121	2.66276	1.0687	0.757976
Tmem106a	uc007jpn.1	BC022145	A2A4N1	transmembrane protein 106A	5.24302	1.68433	3.22781
Fam55d	uc009phv.1	AK048132	Q52KP5-2	RecName: Full=Protein FAM55D; Flags: Precursor;	2.29829	0.362203	0.545888
2810474O19Rik	uc009eud.2	NM_026054	B2KFD2	hypothetical protein LOC67246	5.81323	7.95999	8.37272
9030619P08Rik	uc007wgt.1	NM_001039720	Q5M8M1	RIKEN cDNA 9030619P08	58.4738	40.5656	35.1737
Ccdc109b	uc008rir.2	NM_025779	Q81051	coiled-coil domain-containing protein 109B	2.76586	0.32056	1.44077
I830077J02Rik	uc008qvk.1	NM_001033780	Q3U7U4	transmembrane protein Clorf162 homolog	10.1128	2.97916	6.46891
AI607873	uc011www.1	BC150711	BC150711	clone MGC:183622 IMAGE:9087622, complete cds.	11.7475	2.83273	5.28996
AF251705	uc007mge.1	NM_134158	Q77SN2-2	CMRF35-like molecule	7.78379	1.21242	3.5898
Gm15800	uc008ziw.1	AK037367	Q6ZQ86	SubName: Full=MKIAA0614 protein; Flags: Fragment;	2.67368	5.15396	4.81499
Fbxl20	uc009vah.1	EF649694	Q9CZV8-3	F-box/LRR-repeat protein 20	3.04922	4.52003	5.07914
Trp53l11	uc008ffq.1	NM_001025246	Q4QQM4	tumor protein p53-inducible protein 11	23.2338	30.1507	35.1462
Clec12a	uc009eff.2	NM_177686	Q504P2	C-type lectin domain family 12 member A	45.0243	22.6797	34.6694

HuGo unclassified	UCSC gene	GenBank	UniProt	gene name	Young	Tif1y ^{-/-}	Old
Aim1	uc007ezq.2	NM_172393	Q4VC42	absent in melanoma 1 protein	2.16717	1.09527	1.47526
Lilrb4	uc007far.1	AK170368	Q549E3	SubName: Full=Gp49A; SubName: Full=MC6119532, isoform CRA_s;	7.0096	1.52093	1.49557
Lrrc25	uc009maz.1	NM_153074	B9EHD0	leucine-rich repeat-containing protein 25	9.34234	2.36249	4.99788
Lins	uc009hhs.2	NM_001191001	Q3U1D0-3	protein Lines homolog 1 isoform 2	1.39368	0.516634	0.454878
Metrl	uc007mwd.1	NM_144797	Q8VE43	meteorin-like protein precursor	5.2604	2.04691	2.67665
Ms4a6b	uc008gsk.1	NM_027209	Q99N09	membrane-spanning 4-domains subfamily A member	28.8183	13.3662	12.936
Prr5l	uc008lhp.2	NM_175181	A2AVJ5	proline-rich protein 5-like	2.01962	0.362312	1.01418
Phf21b	uc007xco.2	NM_001081166	Q8C966	PHD finger protein 21B	0	0.247916	0.249587
Zfp820	uc008arj.1	BC019219	Q8VECI	zinc finger protein 820	0	0.71597	1.08084
Ccdc122	uc007urt.1	BC096577	Q4VA24	SubName: Full=Ccdc122 protein;	0	1.42059	0.979788
6030458C11Rik	uc007vhy.2	AK171821	Q8BGC1	RecName: Full=UPF0489 protein CSorf22 homolog;	0	1.88364	1.37224
Fam53c	uc008elm.1	BC044896	Q8BXQ8	RecName: Full=Protein FAM53C;	0	0.598628	2.30778
2310028H24Rik	uc008siz.2	NM_027993	A2ANP3	hypothetical protein LOC71901 isoform 2	0	0.418395	0.758167
Krba1	uc009btz.2	AK128931	Q6NXZ1	protein KRBA1	0	0.149382	0.491732
Tmem104	uc011yhj.1	AK040894	A2A6S1	transmembrane protein 104	0	0.447177	0.761562
Sec14l1	uc011yih.1	NM_001166507	Q99J07	SEC14-like 1 isoform 3	0	1.2671	0.929719
Trem1	uc012ava.1	BC111875	Q14DT9	SubName: Full=Trem1 protein;	0	0.249816	0.510219
6430550D23Rik	uc012chn.1	NM_001145351	A3KGI9	hypothetical protein LOC320095 isoform 1	0	0.169021	0.194967
Lins	uc012fmu.1	NM_152815	Q3U1D0	protein Lines homolog 1 isoform 1	0	0.349611	0.212324
Zfp317	uc012gos.1	AK045365	Q8BLF0	zinc finger protein 317	0	0.216248	0.448118
E330016A19Rik	uc012gxf.1	AK030292	D3ZSR0	uncharacterized protein E330016A19Rik	0	0.651197	2.08064
Mertk	uc008mgu.1	AK030158	Q8CE52	SubName: Full=Putative uncharacterized protein; Flags: Fragment	0.167236	0	0
Pgbd1	uc011yww.1	NM_001012311	Q5FWH8	piggyBac transposable element derived 1 isoform	0.225281	0	0
BC049352	uc009pfm.1	NM_001198971		hypothetical protein LOC408059	0.239049	0	0
Gm3336	uc012gfe.1	NM_001195253		hypothetical protein LOC100041434	0.271092	0	0
1700067K01Rik	uc012ggu.1	NM_183097	B7ZW78	hypothetical protein LOC73453	0.387258	0	0
Depdc5	uc008xab.1	AK166366		DEP domain-containing protein 5 isoform 2	0.500415	0	0
BC052040	uc012cbe.1	NM_001145898	B1AY51	hypothetical protein LOC399568 isoform 1	0.50893	0	0
2310035C23Rik	uc007cgm.2	NM_029349	Q148V7-2	hypothetical protein LOC227446 isoform 2	0.599265	0	0
Shkbp1	uc009fvy.1	AK160641	Q6P7W2-2	SH3KBP1-binding protein 1	1.58371	0	0
Evl5l	uc009kte.1	AK159998	Q3U1G0	SubName: Full=Putative uncharacterized protein;	0.377033	0	0
Gm4902	uc011zml.1	NM_001164327	Q8BVM9	PHD finger protein 11 family member	11.7151	6.25049	8.00432
Xlr	uc009tfl.1	NM_011725	Q9D6C3	X-linked lymphocyte-regulated protein PM1	2.05589	1.1119	1.0976
Znfx1	uc008nzc.1	NM_001033196	A2ASR3	NFX1-type zinc finger-containing protein 1	4.38474	2.65918	1.59268
Lilrb3	uc009ewb.2	NM_011095	D3Z3W9	paired-Ig-like receptor B	6.53134	1.16891	3.8357
Pira6	uc009exh.1	NM_008848	P97484	paired-Ig-like receptor A6 isoform a	1.97721	0.34299	0.961334

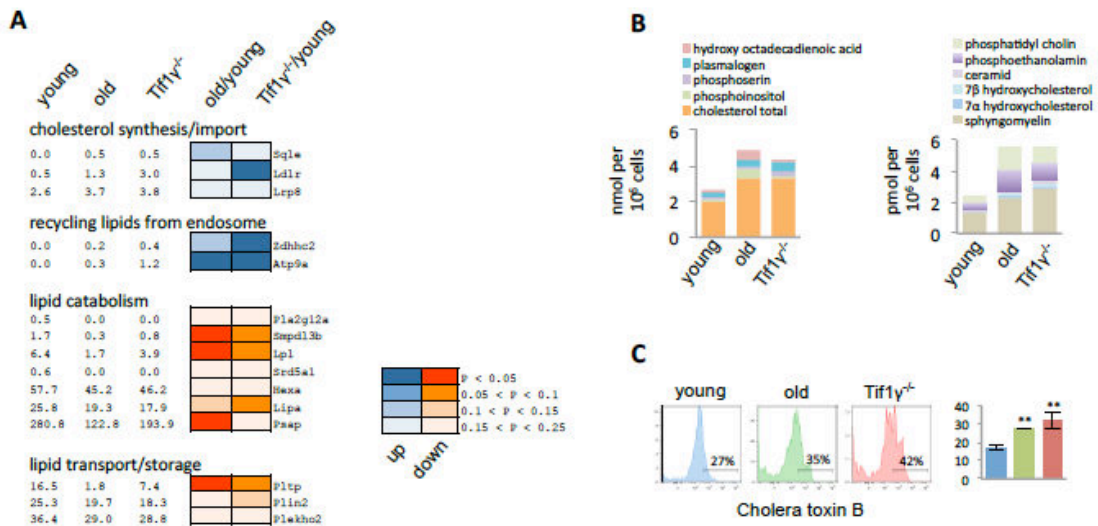


Figure S6: Tif1y^{-/-} and old HSCs show increased cholesterol metabolism. (A) Cluster of genes involved in the metabolism of lipids that were commonly found deregulated. Data shows millions of reads and Log² fold changes. (B) Quantification of different lipids by mass spectrometry among lineage depleted BM cells (in each group, cells were pooled from 4 mice). (C) Quantification of the lipid rafts by flow cytometry with the Cholera toxin B on LSK cells. Representative FACS plots, means (n=3 mice) with error bars that show SEM. **p<0.01.

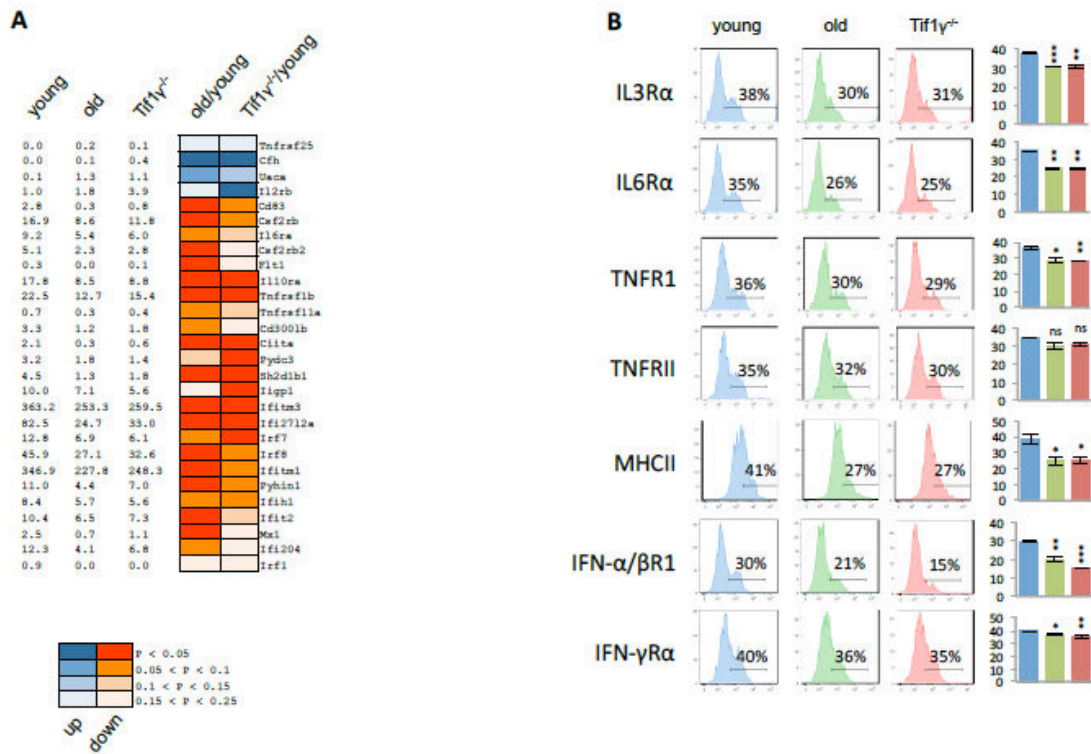
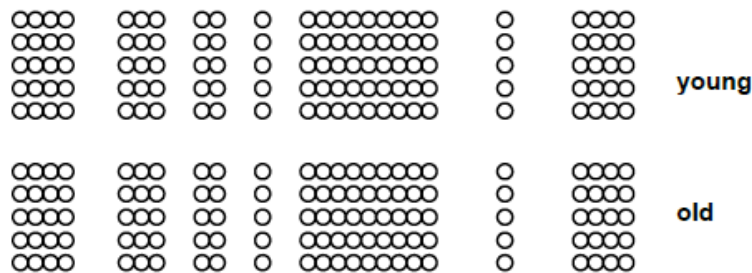


Figure S7: Tif1 γ ^{-/-} and old HSCs show reduced expression of several key receptors involved in hematopoiesis. (A) Cluster of genes encoding receptors or receptor-inducible genes. Data shows millions of reads and Log₂ fold changes. (B) Quantification by flow cytometry of the receptors on LSK cells. Representative FACS plots, means (n=3 mice) with error bars that show SEM. Significance is indicated on the figure with the following convention: *p<0.1, **p<0.01, ***p<0.001.

A

ACC^{CGGGGA}CG^{CC}GAGTGA^{ATTCTCGGGATATAATATTGGTTAGAAACATGGTCTCCCAA}ACTGGCACATCAGCCGC
 AGGGACTTTTCAACATTCATCTGGTTTCAACTTCCTGATTCTGTTTTGGGGTGTGGCCCTGGCATCTCTGTTTAGAAA
 AAGTCAATTGATTGGCTTTAGGATGAGCAACGTTGGAGAATCACCTTAAGAAGCTAAAAATAGCTATTAGAAGACTT
 CTGTCTACCCGACAGGAGCCTATATCTGGAGACTTTTGGGGTGTGTGTGACGTGGTGGGGGAACTCTG^{CGCAGCCG}
 CTCT^{CGGGTGTACAGCCCTCTAGAGAAC}CG^{CGGTCCAGCAACACCCAGCGAAGACCCAGGTGGTCCGCACCTCCTC}
 GGTAGGAGGCTCCGCGACCAAGCGCGCGACAGGTGAAGCTTCCGCGGTGGCGCGCCCGTCGCTGGGGATGG^{CG}
 TCG^{CGTGGAGACGCTCGCTCGGGGGCGAACGCAAGCGGGCCTCTACTCCTGCATGTTTTCCCTCCCTTCTCCCG}
 CACCACCG^{CGGCTTCGGCGCTAGCAGCCACATCATAGAGACCCAGTTCACCAGCTCCTACCGAGCTACACA}ACTCC
 AGCCGGGTGGCAACAGACCACACCGAGGCGCGGAGCTGCATCGCGGTCTGTCCCGCGAGCGCGCGCGGGCCGGAG
 TTCCCGCTCCCTCCGGAGGACGTCGGTGCATCGTGCCTGCCACCCCTCCCGCCCGCGACGCGAGGGCGG
 GGGCGCGCGTGCAGCGCGCTCTCGTGCCTCGCTCGCTCGCTCGCTCGCTACTTCGCTCGCTCTCGGGGCCG
 CTCTTGTGTGGTGC^{GGT}GAGGCTGGGGCGGGCGGGCGGGCGGAGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGTCCG
 CGGGTTCAAAGAGGAAAACATG



B

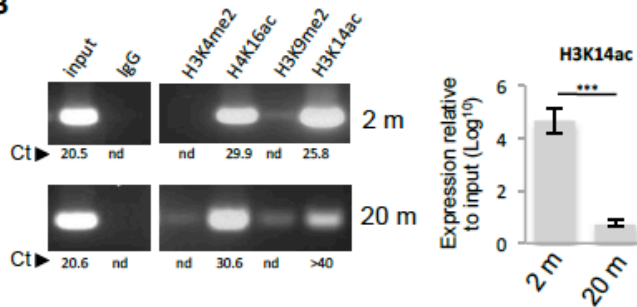


Figure S8: Methylation and chromatin immunoprecipitation of histones on the promoter of the *Tifly* gene. (A) The nucleotide sequence of the *Tifly* promoter. In red, CpGs studied by pyrosequencing. No methylation was detected on the studied CpG (white circles) for both young and old mice. Genomic DNA (500 ng) was purified from HSCs (LSK population) isolated five 4-month-old (young) and five 20-month-old (old) wild type mice. (B) Chromatin immunoprecipitation of different histones followed by real-time qPCR on the promoter of the *Tifly* gene in LSK (30,000 sorted cells), showing that acetylation of the histone H3K14 was decreased in 20-month-old LSK, compared with 2-month-old LSK. Migration of the qPCR products on agarose, with the Ct values reported below (nd: not detected) is shown on the left. Quantification of the *Tifly* promoter compared with the input is shown on the right. Means (n=3 mice), error bars represent SEM. ***p<0.001.

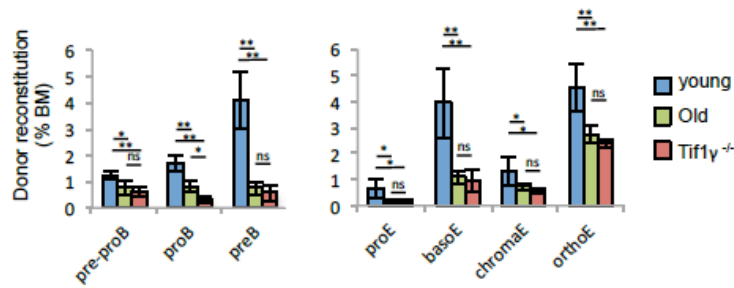


Figure S9: Frequencies of B lymphoid progenitors and erythroid progenitors. Frequencies of donor-derived pre-proB, proB, preB, proE, basoE, chromaE and orthoE in the bone marrow of mice that were long-term reconstituted with 100 SLAM cells, isolated from 4-month-old Tif1 $\gamma^{-/-}$ mice (white), 20-month-old (grey) or 4-month-old (black) wild type mice. Means (n=7 recipients), error bars represent SEM. *p<0.1, **p<0.01.

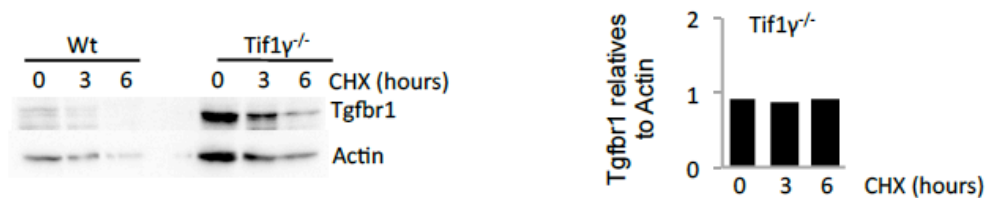


Figure S10: Time course analysis of Tgfb1 protein stability after cycloheximide (CHX) treatment, to block protein synthesis. Tgfb1 protein levels at 0, 3 and 6 hours after cycloheximide addition were analyzed by Western Blotting and compared to Actin levels. On the right is shown the relative quantification for the Tif1 $\gamma^{-/-}$ line.

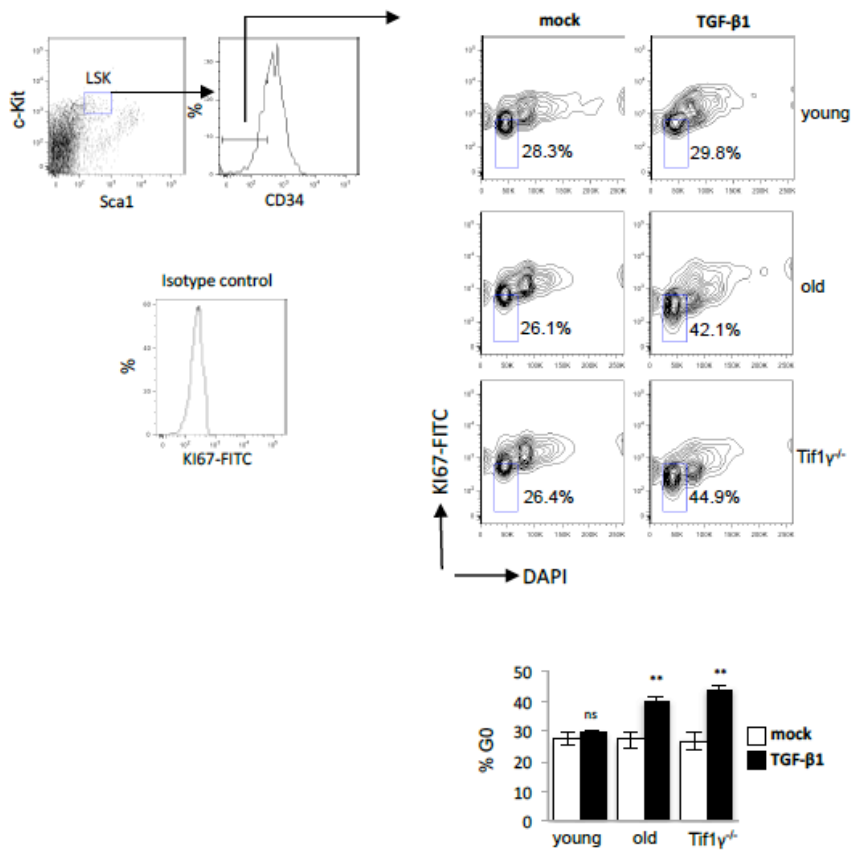


Figure S11: Increased proportion of dormant HSCs in BM isolated from Tif1 $\gamma^{-/-}$ and old mice treated with recombinant TGF- β 1. Mice received three intraperitoneal injections of 5 μ g/Kg TGF- β 1, 24h apart, and PB was analyzed 48h after the last injection. PBS1x was used as control (mock). Data shows G0 cells (KI67⁺) on LSK CD34⁻ gated cells for three mice in each group. **p<0.01.

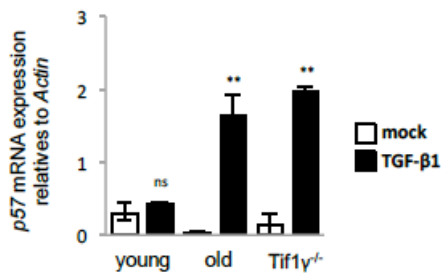


Figure S12: After injection of recombinant TGF- β 1 *in vivo*, HSCs exposed to high level of TGF- β 1 were analyzed *ex vivo*. Data shows the p57 mRNA expression relative to *Actin* in young, old and Tif1 $\gamma^{-/-}$ HSCs. Means (n=2 mice)**p<0.01.

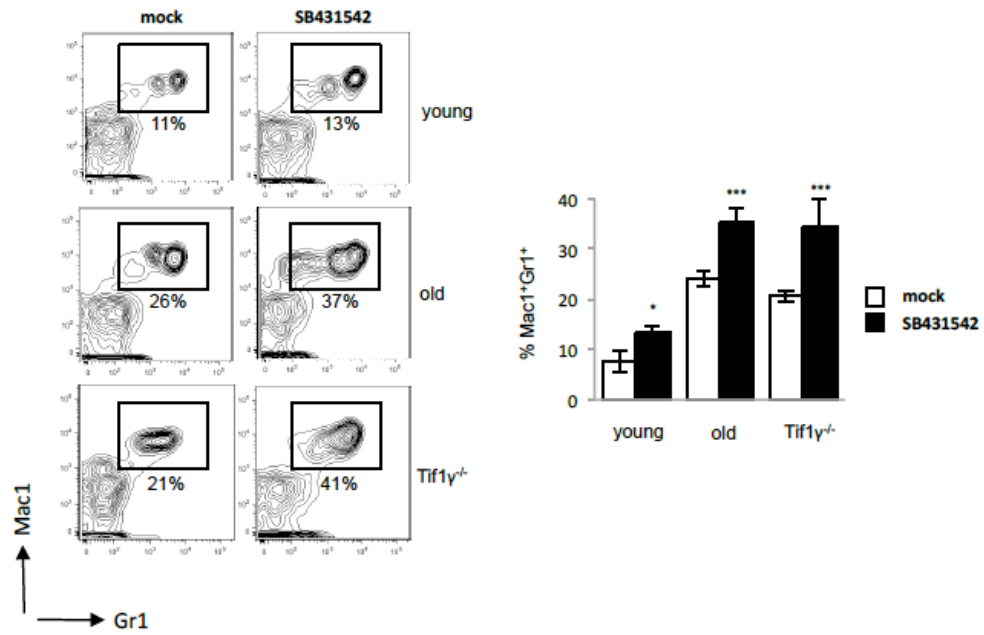


Figure S13: Inhibition of the TGF- β 1 receptor by injection of SB431542 in Tif1 $\gamma^{-/-}$ and old mice accentuates the myeloproliferative phenotype. Mice received two injections of 4 μ mol/Kg SB431542, 24h apart, and PB was analyzed one week after the last injection. PBS1x was used as control (mock). Data shows the percentage of myeloid cells (Mac1⁺Gr1⁺) for four mice in each group. Representative FACS plots, means (n=3 mice) with error bars that show SEM. *p<0.1, ***p<0.001.

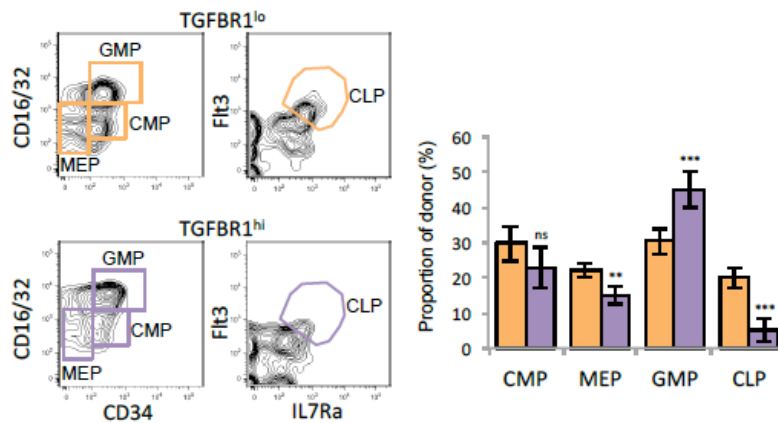


Figure S14: Proportion of donor-derived progenitors in the BM of mice that were long-term reconstituted with 30 Tgfb1^{lo} or Tgfb1^{hi} SLAM cells, sixteen weeks after the transplantation. Common-lymphoid progenitors (CLP), granulocyte-macrophage progenitors (GMP) and megakaryocyte-erythroid progenitors (MEP) and common-myeloid progenitors (CMP). Representative FACS plots, means (n=5 recipients) with error bars that show SEM. **p<0.01, ***p<0.001.

Au cours de mon internat d'hématologie-maladie du sang, j'ai eu le privilège d'effectuer un stage de six mois au sein de l'unité de génomique du myélome du Professeur Hervé Avet-Loiseau à Toulouse.

Mon travail de recherche a consisté en l'étude de la prévalence de la mutation TP53 chez les patients porteurs d'une délétion 17p dont le pronostic est particulièrement péjoratif au cours de cette hémopathie maligne. Les données de ce travail sont en cours d'analyses statistiques afin d'être publiées.

Parallèlement à cela, nous nous sommes intéressés aux patients atteints de myélome multiple âgés de moins de 65 ans. Nous avons montré que l'âge est un facteur pronostic au sein de cette population. Ainsi, les patients âgés de moins de 60 ans ont un meilleur pronostic que les patients dont l'âge se situe entre 60 et 65 ans, caractérisés par une survie globale plus longue. Cette étude portant sur 2316 patients a été publiée en 2014 dans la revue *Haematologica*.

Age is a prognostic factor even among patients with multiple myeloma younger than 66 years treated with high-dose melphalan: the IFM experience on 2316 patients

Marie-Lorraine Chretien,^{1,2*} Benjamin Hebraud,^{1,*} Valérie Cances-Lauwers,³ Cyrille Hulin,⁴ Gerald Marit,⁵ Xavier Leleu,⁶ Lionel Karlin,⁷ Murielle Roussel,⁸ Anne-Marie Stoppa,⁹ Francois Guilhot,¹⁰ Thierry Lamy,¹¹ Laurent Garderet,¹² Brigitte Pegourie,¹³ Mamoun Dib,¹⁴ Catherine Sebban,¹⁵ Pascal Lenain,¹⁶ Sabine Brechignac,¹⁷ Bruno Royer,¹⁸ Marc Wetterwald,¹⁹ Laurence Legros,²⁰ Frédérique Orsini-Piocelle,²¹ Laurent Voillat,²² Xavier Delbrel,²³ Denis Caillot,² Margaret Macro,²⁴ Thierry Facon,⁶ Michel Attal,⁸ Philippe Moreau,²⁵ Hervé Avet-Loiseau,² and Jill Corre¹

¹Unité de Génomique du Myérome, University Hospital; CRCT, INSERM U 1037; Université Paul Sabatier, Toulouse; ²Department of Hematology, University Hospital, Dijon; ³Service d'Epidémiologie, CHU Toulouse; ⁴Department of Hematology, University Hospital, Nancy; ⁵Department of Hematology, University Hospital, Bordeaux; ⁶Department of Hematology, University Hospital, Lille; ⁷Department of Hematology, University Hospital, Lyon; ⁸Department of Hematology, University Hospital, Toulouse; ⁹Department of Hematology, Institut Paoli Calmette, Marseille; ¹⁰CIC Inserm O802, Centre Hospitalier Universitaire, Poitiers; ¹¹Department of Hematology, University Hospital, Rennes; ¹²Department of Hematology, University Hospital, St-Antoine, Paris; ¹³Department of Hematology, University Hospital, Grenoble; ¹⁴Department of Hematology, University Hospital, Angers; ¹⁵Department of Hematology, Centre Léon Bérard, Lyon; ¹⁶Department of Hematology, Centre Becquerel, Rouen; ¹⁷Department of Hematology, University Hospital, Bobigny; ¹⁸Department of Hematology, University Hospital, Amiens; ¹⁹Department of Hematology, Departmental Hospital, Dunkerque; ²⁰Department of Hematology, University Hospital, Nice; ²¹Department of Hematology, Departmental Hospital, Annecy; ²²Department of Hematology, Departmental Hospital, Chalon; ²³Department of Hematology, Departmental Hospital, Pau; ²⁴Department of Hematology, University Hospital, Caen; and ²⁵Department of Hematology, University Hospital, Nantes, France

*MLC and BH contributed equally to this work.

ABSTRACT

Age is a strong prognostic factor in multiple myeloma. The overall survival is shorter in patients older than 66 years, and even shorter in those older than 75 years. Whether age is also a prognostic parameter in patients younger than 66 years treated homogeneously with intensive approaches is unknown. To address this issue, we retrospectively analyzed a series of 2316 patients treated homogeneously with 3-4 cycles of induction chemotherapy followed by a high-dose melphalan course, without any consolidation or maintenance. We show that patients older than 60 years have a statistically significant shorter overall survival. The analysis of prognostic parameters did not show a higher incidence of high-risk cytogenetics, but a higher incidence of International Staging System (ISS) stages 2 and 3, mainly due to higher $\beta 2$ -microglobulin levels. This study is the first to demonstrate the impact of age in the outcome of 'young' patients with multiple myeloma, and suggests that this parameter should be included in the stratification factors for future prospective clinical trials.

Introduction

Age is a prognostic factor observed in every kind of cancers. Many factors can explain this finding: more co-morbidities in elderly, poorer renal and liver functions affecting the metabolism of anticancer drugs, but also more adverse prognostic factor sometimes observed in older patients (like Ph1-positivity in acute lymphoblastic leukemias). In multiple myeloma (MM), age is also a strong prognostic parameter. Indeed, the median overall survival (OS) of patients older than 65 years of age is currently approximately 4-6 years, whereas it is around ten years for younger patients. Apart from co-morbidities (that are of course more frequent in elderly patients), this important difference in survival is mainly due to the treatment approaches used in these two populations. Patients under 66 years of age are treated with a much more aggressive approach including triplet induction, high-dose melphalan with autologous stem cell rescue, and consolidation, than older patients who are not able to

tolerate the high-dose procedure. Regarding other prognostic factors, we previously reported that elderly patients do not present a higher incidence of adverse cytogenetic abnormalities.^{1,2,6}

Whether age could also affect the outcome of young patients (< 66 years) is an unresolved question. Only one report suggests that age could impair the outcome.² In order to address these questions, we retrospectively analyzed a large series of 2316 patients diagnosed with MM before their 66th birthday, all treated with high-dose melphalan, and systematically analyzed at diagnosis for the two main adverse chromosomal abnormalities, i.e. t(4;14) and del(17p).

Methods

We searched the Intergroupe Francophone du Myérome (IFM) database for patients younger than 66 years of age treated with high-dose melphalan who had benefited from a cytogenetic evaluation. Patients were diagnosed between 1999 and 2010 in one of the IFM centers. For

©2014 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper. doi:10.3324/haematol.2013.098608
Manuscript received on September 24, 2013. Manuscript accepted on April 7, 2014.
Correspondence: avet-loiseau.h@chu-toulouse.fr or corre.j@chu-toulouse.fr

all the patients, a bone marrow sample was shipped overnight to a central laboratory. Upon receipt, malignant plasma cells were purified for fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis, as previously described.³ For the large majority of these patients, blood was also sent, enabling a centralized assessment of the β 2-microglobulin (β 2m) level. To be enrolled, patients must have received an induction therapy and 1 or 2 courses of high-dose melphalan. We excluded patients who had received a consolidation or maintenance regimen, and patients who had received an allogeneic transplant.

Results

We found 2316 patients responding to these criteria. The median age was 57 years (range 23-65), with 65% under 60 years; 56% were males. Approximately half of the patients (1142 patients, 49.3%) received a VAD induction regimen (vincristine-adriamycin-dexamethasone), the other patients (1174 patients, 50.7%) receiving a bortezomib-based induction, combined with dexamethasone +/- thalidomide. This stratification is essentially dependent on the date of diagnosis with a change in 2006-2007 after the results of the IFM 2005-01 trial had been made available.⁴ All the patients received a single or double high-dose melphalan course. No patient received either a consolidation regimen, or a maintenance therapy. β 2m was available for 92% of the patients; median value was 3.3 mg/L (range 0.6-55.3). The International Staging System (ISS)⁵ category was available for 80% of the patients, with respectively 34.7%, 38.3%, and 27% of stage 1, 2 and 3. Out of 2048 patients evaluable for the del(17p) (11.6% had been compromised by technical failure), 171 patients (8.3%) presented a deletion in more than 60% of their

plasma cells. Regarding the t(4;14), 2036 patients were evaluable (failure rate 12.1%) and 248 of them were positive for the translocation (12.2%).

Data were then analyzed according to age with a 60-year cut off. More ISS 2 and 3 were observed in the older group, with respectively 37.2%, 37.1% and 25.6% ISS 1, 2 and 3 in the younger patients versus 30%, 40.4% and 29.7% in the older group ($P < 0.007$). The statistical difference between these results are mainly due to a higher β 2m level in patients older than 60 years, and less frequently to a lower albumin level. Regarding the two chromosomal abnormalities, no incidence difference was observed: 8.2% versus 8.5% for del(17p), and 11.6% versus 13.3% for t(4;14) (NS).

We also looked at the incidence of these chromosomal abnormalities in particularly young patients, i.e. those under 45 years of age. No difference was observed, with an incidence of del(17p) and t(4;14) of 7.1% and 13.1%, respectively, that showed no significant difference from the other patients.

Patients were then analyzed for overall survival (OS). Median OS was 100 months. Treatment induction did not affect outcome. The risk of death increased linearly with age, with an increased risk of 22% every ten years. With a cut off at 60 years, older patients presented a significantly shorter OS ($P = 0.003$) (Figure 1). In the univariate analysis, other factors associated with outcome (OS) were the ISS, with Hazard Ratios (HR) of 1.41 and 2.45 for ISS 2 and 3 as compared to ISS 1, presence of a del(17p) in more than 60% of the plasma cells (HR=3.47), presence of the t(4;14) (HR=2.60), and a hemoglobin level lower than 10 g/dL (HR=1.75). In the multivariate analysis, age (HR=1.23), ISS 3 (HR=2.04), del(17p) (HR=1.93), and t(4;14) (HR=2.37) were independent prognostic factors.

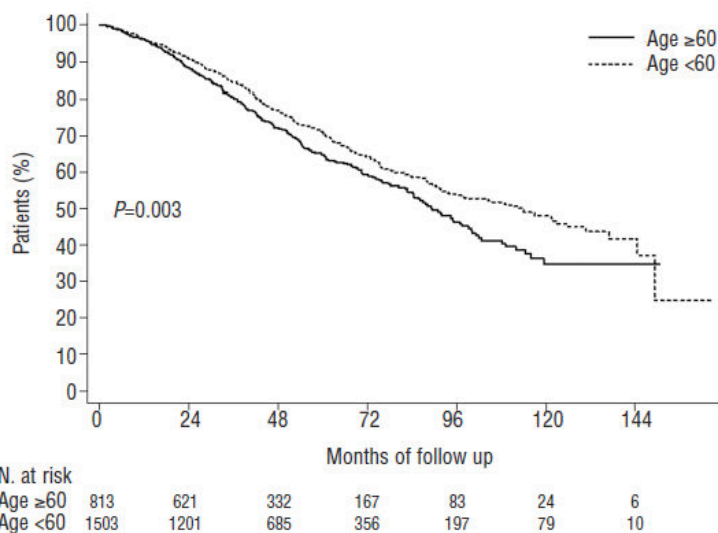


Figure 1. Impact of age (< 60 vs. > 60 years) on the overall survival.

Discussion

In MM, it has been known for a long time that age is a strong prognostic factor. Currently, most investigators choose a cut off at 65 years in their design of clinical trials. This cut off is essentially based on the feasibility of high-dose melphalan after this age with more side-effects. Whether this barrier can be increased to 70 years, or even higher for fit patients, is a matter of debate. In elderly patients, age is a known prognostic parameter, especially for very old patients (> 75-80 years).⁶ In 'young' patients (< 65 years), few large series has investigated this parameter. One study suggested a better outcome for patients younger than 40 years,⁷ but these patients were treated in the 1980s when only melphalan and steroids were available. A more recent retrospective study did analyze patients under 50 years of age.⁸ This study showed a better outcome for young patients when treated with standard doses of chemotherapy, but not if treated with high-dose melphalan.

In this series, we analyzed a large number of patients (> 2000) in order to address these questions. Our findings are quite interesting. First, very young patients do not seem to present a characteristic disease. They display similar incidences of high-risk cytogenetic changes, and their outcome is not statistically different to that of patients aged 46-60 years. In the analysis, the prognostic impact of age showed a linear importance of age on the risk of death, with a 22% increase every ten years. This higher risk is especially prominent in patients older than 60 years. This

higher risk of death does not seem to be related to cytogenetic factors, with a similar incidence of high-risk markers. The main explanation is related to ISS. We found a significant higher percentage of ISS 2 and 3 stages after 60 years of age. This finding is essentially related to a higher $\beta 2m$ level. The $\beta 2m$ level is mainly related to two factors: i) release from plasma cell surface via shedding; and ii) elimination via renal filtration. A higher production of $\beta 2m$ could be due to a higher tumor burden, or a higher shedding activity. These two hypotheses are rather unlikely in this specific age population. A lower elimination rate is a more likely hypothesis. Even though we did not observe a higher creatinine level in the 60-65 years population (data available for less than half of the patients), it is well known that renal function decreases with age. Whether this observation is true as early as the age of 60 years is unknown, but remains the most likely explanation.

We are not aware of a large study that has analyzed this parameter before. Does it mean that these patients should not be treated with high-dose approaches? Probably not, since in our series the outcome of these patients is quite good (median OS = 89 months). However, we believe that this cut off should be included in the stratification strategies when designing a new trial.

Authorship and Disclosures

Information on authorship, contributions, and financial & other disclosures was provided by the authors and is available with the online version of this article at www.haematologica.org.

References

1. Avet-Loiseau H, Hulin C, Campion L, Rodon F, Marit G, Attal M, et al. Chromosomal abnormalities are major prognostic factors in elderly patients with multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2013;31(22):2806-9.
2. Lenhoff S, Hjorth M, Westin J, Brinch L, Backstrom B, Karlson K, et al. Impact of age on survival after intensive therapy for multiple myeloma: a population-based study by the Nordic Myeloma Study Group. *Br J Haematol*. 2006;133(4):389-96.
3. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau F, Charbonnel C, Garban F, Hulin C, et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood*. 2007;109(8):3489-95.
4. Moreau F, Avet-Loiseau H, Facon T, Attal M, Tiab M, Hulin C, et al. Bortezomib plus dexamethasone versus reduced-dose bortezomib, thalidomide plus dexamethasone as induction treatment before autologous stem cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*. 2011;118(22):5752-8.
5. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Blade J, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005;23(15):3412-20.
6. Brinthen S, Mateos MV, Zweegman S, Larocca A, Falcone AP, Oriol A, et al. Age and organ damage correlate with poor survival in myeloma patients: meta-analysis of 1435 individual patient data from 4 randomized trials. *Haematologica*. 2013;98(6):980-7.
7. Bladé J, Kyle RA, Greipp PR. Presenting features and prognosis in 72 patients with multiple myeloma who were younger than 40 years. *Br J Haematol*. 1996;93(2):345-51.
8. Ludwig H, Durie BG, Bolejack V, Turesson I, Kyle RA, Blade J, et al. Myeloma in patients younger than age 50 years presents with more favorable features and shows better survival: an analysis of 10 549 patients from the International Myeloma Working Group. *Blood*. 2008;111(8):4039-47.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, Garcia-Manero G, Patel J, Wadleigh M, Malinge S, Yao J, Kilpivaara O, Bhat R et al. 2009. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood* **114**: 144-147.
- Abdel-Wahab O, Pardanani A, Patel J, Wadleigh M, Lasho T, Heguy A, Beran M, Gilliland DG, Levine RL, Tefferi A. 2011a. Concomitant analysis of EZH2 and ASXL1 mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* **25**: 1200-1202.
- Abdel-Wahab O, Pardanani A, Rampal R, Lasho TL, Levine RL, Tefferi A. 2011b. DNMT3A mutational analysis in primary myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and advanced phases of myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* **25**: 1219-1220.
- Adeegbe D, Serafini P, Bronte V, Zoso A, Ricordi C, Inverardi L. 2011. In vivo induction of myeloid suppressor cells and CD4(+)Foxp3(+) T regulatory cells prolongs skin allograft survival in mice. *Cell transplantation* **20**: 941-954.
- Agricola E, Randall RA, Gaarenstroom T, Dupont S, Hill CS. 2011. Recruitment of TIF1gamma to chromatin via its PHD finger-bromodomain activates its ubiquitin ligase and transcriptional repressor activities. *Molecular cell* **43**: 85-96.
- Akagi T, Saitoh T, O'Kelly J, Akira S, Gombart AF, Koeffler HP. 2008. Impaired response to GM-CSF and G-CSF, and enhanced apoptosis in C/EBPbeta-deficient hematopoietic cells. *Blood* **111**: 2999-3004.
- Akiyama Y, Stevenson GW, Schlick E, Matsushima K, Miller PJ, Stevenson HC. 1985. Differential ability of human blood monocyte subsets to release various cytokines. *Journal of leukocyte biology* **37**: 519-530.
- Alliot F, Godin I, Pessac B. 1999. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res Dev Brain Res* **117**: 145-152.
- Almand B, Clark JI, Nikitina E, van Beynen J, English NR, Knight SC, Carbone DP, Gabrilovich DI. 2001. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *Journal of immunology* **166**: 678-689.
- Almeida J, Bueno C, Alguero MC, Sanchez ML, de Santiago M, Escribano L, Diaz-Agustin B, Vaquero JM, Laso FJ, San Miguel JF et al. 2001. Comparative analysis of the morphological, cytochemical, immunophenotypical, and functional characteristics of normal human peripheral blood lineage(-)/CD16(+)/HLA-DR(+)/CD14(-/lo) cells, CD14(+) monocytes, and CD16(-) dendritic cells. *Clinical immunology* **100**: 325-338.
- Anastas JN, Moon RT. 2013. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nature reviews Cancer* **13**: 11-26.
- Aribi A, Borthakur G, Ravandi F, Shan J, Davissou J, Cortes J, Kantarjian H. 2007. Activity of decitabine, a hypomethylating agent, in chronic myelomonocytic leukemia. *Cancer* **109**: 713-717.
- Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B. 2007. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *The Journal of experimental medicine* **204**: 1057-1069.
- Aucagne R, Droin N, Paggetti J, Lagrange B, Largeot A, Hammann A, Bataille A, Martin L, Yan KP, Fenaux P et al. 2011. Transcription intermediary factor 1gamma is a tumor suppressor in mouse and human chronic myelomonocytic leukemia. *The Journal of clinical investigation* **121**: 2361-2370.

- Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, Sarnacki S, Cumano A, Lauvau G, Geissmann F. 2007. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* **317**: 666-670.
- Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. 2009. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual review of immunology* **27**: 669-692.
- Aziz A, Vanhille L, Mohideen P, Kelly LM, Otto C, Bakri Y, Mossadegh N, Sarrazin S, Sieweke MH. 2006. Development of macrophages with altered actin organization in the absence of MafB. *Mol Cell Biol* **26**: 6808-6818.
- Bacher U, Haferlach T, Schnittger S, Kreipe H, Kroger N. 2011. Recent advances in diagnosis, molecular pathology and therapy of chronic myelomonocytic leukaemia. *British journal of haematology* **153**: 149-167.
- Bai X, Kim J, Yang Z, Jurynech MJ, Akie TE, Lee J, LeBlanc J, Sessa A, Jiang H, DiBiase A et al. 2010. TIF1gamma controls erythroid cell fate by regulating transcription elongation. *Cell* **142**: 133-143.
- Bai X, Trowbridge JJ, Riley E, Lee JA, DiBiase A, Kaartinen VM, Orkin SH, Zon LI. 2013. TIF1-gamma plays an essential role in murine hematopoiesis and regulates transcriptional elongation of erythroid genes. *Developmental biology* **373**: 422-430.
- Bakri Y, Sarrazin S, Mayer UP, Tillmanns S, Nerlov C, Boned A, Sieweke MH. 2005. Balance of MafB and PU.1 specifies alternative macrophage or dendritic cell fate. *Blood* **105**: 2707-2716.
- Bartova E, Pachernik J, Kozubik A, Kozubek S. 2007. Differentiation-specific association of HP1alpha and HP1beta with chromocentres is correlated with clustering of TIF1beta at these sites. *Histochem Cell Biol* **127**: 375-388.
- Bayne LJ, Beatty GL, Jhala N, Clark CE, Rhim AD, Stanger BZ, Vonderheide RH. 2012. Tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates myeloid inflammation and T cell immunity in pancreatic cancer. *Cancer cell* **21**: 822-835.
- Becker AM, Michael DG, Satpathy AT, Sciammas R, Singh H, Bhattacharya D. 2012. IRF-8 extinguishes neutrophil production and promotes dendritic cell lineage commitment in both myeloid and lymphoid mouse progenitors. *Blood* **119**: 2003-2012.
- Beckstead R, Ortiz JA, Sanchez C, Prokopenko SN, Chambon P, Losson R, Bellen HJ. 2001. Bonus, a Drosophila homolog of TIF1 proteins, interacts with nuclear receptors and can inhibit betaFTZ-F1-dependent transcription. *Molecular cell* **7**: 753-765.
- Begg SK, Radley JM, Pollard JW, Chisholm OT, Stanley ER, Bertoncello I. 1993. Delayed hematopoietic development in osteopetrotic (op/op) mice. *The Journal of experimental medicine* **177**: 237-242.
- Bejar R, Lord A, Stevenson K, Bar-Natan M, Perez-Ladaga A, Zaneveld J, Wang H, Caughey B, Stojanov P, Getz G et al. 2014. TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients. *Blood* **124**: 2705-2712.
- Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L. 2002. The proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ monocytes are a major source of TNF. *Journal of immunology* **168**: 3536-3542.
- Belloni E, Trubia M, Gasparini P, Micucci C, Tapinassi C, Confalonieri S, Nuciforo P, Martino B, Lo-Coco F, Pelicci PG et al. 2005. 8p11 myeloproliferative syndrome

- with a novel t(7;8) translocation leading to fusion of the FGFR1 and TIF1 genes. *Genes Chromosomes Cancer* **42**: 320-325.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. 1982. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *British journal of haematology* **51**: 189-199.
- Benveniste P, Frelin C, Janmohamed S, Barbara M, Herrington R, Hyam D, Iscove NN. 2010. Intermediate-term hematopoietic stem cells with extended but time-limited reconstitution potential. *Cell Stem Cell* **6**: 48-58.
- Biswas SK, Mantovani A. 2010. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* **11**: 889-896.
- Boelte KC, Gordy LE, Joyce S, Thompson MA, Yang L, Lin PC. 2011. Rgs2 mediates pro-angiogenic function of myeloid derived suppressor cells in the tumor microenvironment via upregulation of MCP-1. *PloS one* **6**: e18534.
- Bonfield TL, Farver CF, Barna BP, Malur A, Abraham S, Raychaudhuri B, Kavuru MS, Thomassen MJ. 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is deficient in alveolar macrophages from patients with alveolar proteinosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **29**: 677-682.
- Bonfield TL, Thomassen MJ, Farver CF, Abraham S, Koloze MT, Zhang X, Mosser DM, Culver DA. 2008. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma regulates the expression of alveolar macrophage colony-stimulating factor. *Journal of immunology* **181**: 235-242.
- Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, Vogelstein B. 1987. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* **327**: 293-297.
- Braun T, Itzykson R, Renneville A, de Renzis B, Dreyfus F, Laribi K, Bouabdallah K, Vey N, Toma A, Recher C et al. 2011. Molecular predictors of response to decitabine in advanced chronic myelomonocytic leukemia: a phase 2 trial. *Blood* **118**: 3824-3831.
- Brito C, Naviliat M, Tiscornia AC, Vuillier F, Gualco G, Dighiero G, Radi R, Cayota AM. 1999. Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death. *Journal of immunology* **162**: 3356-3366.
- Bronte V, Apolloni E, Cabrelle A, Ronca R, Serafini P, Zamboni P, Restifo NP, Zanovello P. 2000. Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood* **96**: 3838-3846.
- Bronte V, Chappell DB, Apolloni E, Cabrelle A, Wang M, Hwu P, Restifo NP. 1999. Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. *Journal of immunology* **162**: 5728-5737.
- Bronte V, Serafini P, Apolloni E, Zanovello P. 2001. Tumor-induced immune dysfunctions caused by myeloid suppressor cells. *Journal of immunotherapy* **24**: 431-446.
- Bronte V, Serafini P, De Santo C, Marigo I, Tosello V, Mazzoni A, Segal DM, Staib C, Lowell M, Sutter G et al. 2003. IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice. *Journal of immunology* **170**: 270-278.
- Bronte V, Wang M, Overwijk WW, Surman DR, Pericle F, Rosenberg SA, Restifo NP. 1998. Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells. *Journal of immunology* **161**: 5313-5320.

- Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. 2006. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol* **169**: 338-346.
- Bunt SK, Yang L, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. 2007. Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer research* **67**: 10019-10026.
- Cain DW, O'Koren EG, Kan MJ, Womble M, Sempowski GD, Hopper K, Gunn MD, Kelsoe G. 2013. Identification of a tissue-specific, C/EBPbeta-dependent pathway of differentiation for murine peritoneal macrophages. *Journal of immunology* **191**: 4665-4675.
- Cammas F, Mark M, Dolle P, Dierich A, Chambon P, Losson R. 2000. Mice lacking the transcriptional corepressor TIF1beta are defective in early postimplantation development. *Development* **127**: 2955-2963.
- Carlberg C, Polly P. 1998. Gene regulation by vitamin D3. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* **8**: 19-42.
- Centuori SM, Trad M, LaCasse CJ, Alizadeh D, Larmonier CB, Hanke NT, Kartchner J, Janikashvili N, Bonnotte B, Larmonier N et al. 2012. Myeloid-derived suppressor cells from tumor-bearing mice impair TGF-beta-induced differentiation of CD4+CD25+FoxP3+ Tregs from CD4+CD25-FoxP3- T cells. *Journal of leukocyte biology* **92**: 987-997.
- Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Druck T, Cannizzaro LA et al. 1992. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* **256**: 97-100.
- Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, Vincent J, Bruchard M, Remy-Martin JP, Boireau W, Rouleau A, Simon B, Lanneau D et al. 2010. Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *The Journal of clinical investigation* **120**: 457-471.
- Chambon M, Orsetti B, Berthe ML, Bascoul-Mollevis C, Rodriguez C, Duong V, Gleizes M, Thenot S, Bibeau F, Theillet C et al. 2011. Prognostic significance of TRIM24/TIF-1alpha gene expression in breast cancer. *Am J Pathol* **178**: 1461-1469.
- Chawla A, Nguyen KD, Goh YP. 2011. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nature reviews Immunology* **11**: 738-749.
- Chen X, Eksioglu EA, Zhou J, Zhang L, Djeu J, Fortenbery N, Epling-Burnette P, Van Bijnen S, Dolstra H, Cannon J et al. 2013. Induction of myelodysplasia by myeloid-derived suppressor cells. *The Journal of clinical investigation* **123**: 4595-4611.
- Cheng P, Corzo CA, Luetsteke N, Yu B, Nagaraj S, Bui MM, Ortiz M, Nacken W, Sorg C, Vogl T et al. 2008. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *The Journal of experimental medicine* **205**: 2235-2249.
- Chitu V, Stanley ER. 2006. Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Current opinion in immunology* **18**: 39-48.
- Chow A, Huggins M, Ahmed J, Hashimoto D, Lucas D, Kunisaki Y, Pinho S, Leboeuf M, Noizat C, van Rooijen N et al. 2013. CD169(+) macrophages provide a niche promoting erythropoiesis under homeostasis and stress. *Nature medicine* **19**: 429-436.
- Chow A, Lucas D, Hidalgo A, Mendez-Ferrer S, Hashimoto D, Scheiermann C, Battista M, Leboeuf M, Prophete C, van Rooijen N et al. 2011. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells

- in the mesenchymal stem cell niche. *The Journal of experimental medicine* **208**: 261-271.
- Christiansson L, Soderlund S, Svensson E, Mustjoki S, Bengtsson M, Simonsson B, Olsson-Stromberg U, Loskog AS. 2013. Increased level of myeloid-derived suppressor cells, programmed death receptor ligand 1/programmed death receptor 1, and soluble CD25 in Sokal high risk chronic myeloid leukemia. *PloS one* **8**: e55818.
- Clark CE, Hingorani SR, Mick R, Combs C, Tuveson DA, Vonderheide RH. 2007. Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion. *Cancer research* **67**: 9518-9527.
- Clear AJ, Lee AM, Calaminici M, Ramsay AG, Morris KJ, Hallam S, Kelly G, Macdougall F, Lister TA, Gribben JG. 2010. Increased angiogenic sprouting in poor prognosis FL is associated with elevated numbers of CD163+ macrophages within the immediate sprouting microenvironment. *Blood* **115**: 5053-5056.
- Costa R, Abdulhaq H, Haq B, Shaddock RK, Latsko J, Zenati M, Atem FD, Rossetti JM, Sahovic EA, Lister J. 2011. Activity of azacitidine in chronic myelomonocytic leukemia. *Cancer* **117**: 2690-2696.
- Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, Puel A, Biswas SK, Moshous D, Picard C et al. 2010. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* **33**: 375-386.
- Cumano A, Godin I. 2007. Ontogeny of the hematopoietic system. *Annual review of immunology* **25**: 745-785.
- Dahl R, Walsh JC, Lancki D, Laslo P, Iyer SR, Singh H, Simon MC. 2003. Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBPalpha ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nature immunology* **4**: 1029-1036.
- Dai XM, Ryan GR, Hapel AJ, Dominguez MG, Russell RG, Kapp S, Sylvestre V, Stanley ER. 2002. Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* **99**: 111-120.
- Dakic A, Metcalf D, Di Rago L, Mifsud S, Wu L, Nutt SL. 2005. PU.1 regulates the commitment of adult hematopoietic progenitors and restricts granulopoiesis. *The Journal of experimental medicine* **201**: 1487-1502.
- de Bruin AM, Libregts SF, Valkhof M, Boon L, Touw IP, Nolte MA. 2012. IFNgamma induces monopoiesis and inhibits neutrophil development during inflammation. *Blood* **119**: 1543-1554.
- De Palma M, Venneri MA, Galli R, Sergi Sergi L, Politi LS, Sampaolesi M, Naldini L. 2005. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer cell* **8**: 211-226.
- De Santo C, Serafini P, Marigo I, Dolcetti L, Bolla M, Del Soldato P, Melani C, Guiducci C, Colombo MP, Iezzi M et al. 2005. Nitroaspirin corrects immune dysfunction in tumor-bearing hosts and promotes tumor eradication by cancer vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 4185-4190.
- de The H, Lavau C, Marchio A, Chomienne C, Degos L, Dejean A. 1991. The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* **66**: 675-684.
- De Wilde V, Van Rompaey N, Hill M, Lebrun JF, Lemaitre P, Lhomme F, Kubjak C, Vokaer B, Oldenhove G, Charbonnier LM et al. 2009. Endotoxin-induced myeloid-derived

- suppressor cells inhibit alloimmune responses via heme oxygenase-1. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **9**: 2034-2047.
- DeKoter RP, Walsh JC, Singh H. 1998. PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors. *The EMBO journal* **17**: 4456-4468.
- Ding ZY, Jin GN, Wang W, Chen WX, Wu YH, Ai X, Chen L, Zhang WG, Liang HF, Laurence A et al. 2014. Reduced expression of transcriptional intermediary factor 1 gamma promotes metastasis and indicates poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **60**: 1620-1636.
- Donkor MK, Lahue E, Hoke TA, Shafer LR, Coskun U, Solheim JC, Gulen D, Bishay J, Talmadge JE. 2009. Mammary tumor heterogeneity in the expansion of myeloid-derived suppressor cells. *International immunopharmacology* **9**: 937-948.
- Downs JA, Nussenzweig MC, Nussenzweig A. 2007. Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. *Nature* **447**: 951-958.
- Drilon A, Wang L, Hasanovic A, Suehara Y, Lipson D, Stephens P, Ross J, Miller V, Ginsberg M, Zakowski MF et al. 2013. Response to Cabozantinib in patients with RET fusion-positive lung adenocarcinomas. *Cancer discovery* **3**: 630-635.
- Driss V, Quesnel B, Brinster C. 2015. Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1/CCL2) contributes to thymus atrophy in acute myeloid leukemia. *European journal of immunology* **45**: 396-406.
- Droin N, Jacquet A, Hendra JB, Racœur C, Truntzer C, Pecqueur D, Benikhlef N, Ciudad M, Guery L, Jooste V et al. 2010. Alpha-defensins secreted by dysplastic granulocytes inhibit the differentiation of monocytes in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* **115**: 78-88.
- Droin N, Solary E. 2010. Editorial: CSF1R, CSF-1, and IL-34, a "menage a trois" conserved across vertebrates. *Journal of leukocyte biology* **87**: 745-747.
- Du H, Daftary GS, Lalwani SI, Taylor HS. 2005. Direct regulation of HOXA10 by 1,25-(OH)2D3 in human myelomonocytic cells and human endometrial stromal cells. *Molecular endocrinology* **19**: 2222-2233.
- Dugast AS, Haudebourg T, Coulon F, Heslan M, Haspot F, Poirier N, Vuillefroy de Silly R, Usal C, Smit H, Martinet B et al. 2008. Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. *Journal of immunology* **180**: 7898-7906.
- Dumitru CA, Moses K, Trellakis S, Lang S, Brandau S. 2012. Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **61**: 1155-1167.
- Dupont S, Mamidi A, Cordenonsi M, Montagner M, Zacchigna L, Adorno M, Martello G, Stinchfield MJ, Soligo S, Morsut L et al. 2009. FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGFbeta signaling, controls Smad4 monoubiquitination. *Cell* **136**: 123-135.
- Dupont S, Zacchigna L, Cordenonsi M, Soligo S, Adorno M, Rugge M, Piccolo S. 2005. Germ-layer specification and control of cell growth by Ectodermin, a Smad4 ubiquitin ligase. *Cell* **121**: 87-99.
- Dutta P, Hoyer FF, Grigoryeva LS, Sager HB, Leuschner F, Courties G, Borodovsky A, Novobrantseva T, Ruda VM, Fitzgerald K et al. 2015. Macrophages retain hematopoietic stem cells in the spleen via VCAM-1. *The Journal of experimental medicine* **212**: 497-512.

- Dyrskjot L, Kruhoffer M, Thykjaer T, Marcussen N, Jensen JL, Moller K, Orntoft TF. 2004. Gene expression in the urinary bladder: a common carcinoma in situ gene expression signature exists disregarding histopathological classification. *Cancer research* **64**: 4040-4048.
- Eissenberg JC, Elgin SC. 2000. The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Curr Opin Genet Dev* **10**: 204-210.
- Elias JA, Schreiber AD, Gustilo K, Chien P, Rossman MD, Lammie PJ, Daniele RP. 1985. Differential interleukin 1 elaboration by unfractionated and density fractionated human alveolar macrophages and blood monocytes: relationship to cell maturity. *Journal of immunology* **135**: 3198-3204.
- Enioutina EY, Bareyan D, Daynes RA. 2011. A role for immature myeloid cells in immune senescence. *Journal of immunology* **186**: 697-707.
- Erblich B, Zhu L, Etgen AM, Dobrenis K, Pollard JW. 2011. Absence of colony stimulation factor-1 receptor results in loss of microglia, disrupted brain development and olfactory deficits. *PloS one* **6**: e26317.
- Erlebacher A. 2013. Immunology of the maternal-fetal interface. *Annual review of immunology* **31**: 387-411.
- Escobar G, Moi D, Ranghetti A, Ozkal-Baydin P, Squadrito ML, Kajaste-Rudnitski A, Bondanza A, Gentner B, De Palma M, Mazzieri R et al. 2014. Genetic engineering of hematopoiesis for targeted IFN-alpha delivery inhibits breast cancer progression. *Science translational medicine* **6**: 217ra213.
- Fantin A, Vieira JM, Gestri G, Denti L, Schwarz Q, Prykhozhiy S, Peri F, Wilson SW, Ruhrberg C. 2010. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood* **116**: 829-840.
- Fattet L, Ay AS, Bonneau B, Jallades L, Mikaelian I, Treilleux I, Gillet G, Hesling C, Rimokh R. 2013. TIF1gamma requires sumoylation to exert its repressive activity on TGFbeta signaling. *Journal of cell science* **126**: 3713-3723.
- Feinberg MW, Wara AK, Cao Z, Lebedeva MA, Rosenbauer F, Iwasaki H, Hirai H, Katz JP, Haspel RL, Gray S et al. 2007. The Kruppel-like factor KLF4 is a critical regulator of monocyte differentiation. *The EMBO journal* **26**: 4138-4148.
- Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, Schoch R, Gattermann N, Sanz G, List A et al. 2009. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *The Lancet Oncology* **10**: 223-232.
- Fidler IJ. 1978. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer research* **38**: 2651-2660.
- Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Strobel M, Ziegler-Heitbrock HW. 1993. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* **82**: 3170-3176.
- Fortunel N, Hatzfeld J, Kisselev S, Monier MN, Ducos K, Cardoso A, Batard P, Hatzfeld A. 2000. Release from quiescence of primitive human hematopoietic stem/progenitor cells by blocking their cell-surface TGF-beta type II receptor in a short-term in vitro assay. *Stem cells* **18**: 102-111.
- Franc NC, Dimarcq JL, Lagueux M, Hoffmann J, Ezekowitz RA. 1996. Croquemort, a novel Drosophila hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity* **4**: 431-443.

- Franklin RA, Liao W, Sarkar A, Kim MV, Bivona MR, Liu K, Pamer EG, Li MO. 2014. The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. *Science* **344**: 921-925.
- Friedman JR, Fredericks WJ, Jensen DE, Speicher DW, Huang XP, Neilson EG, Rauscher FJ, 3rd. 1996. KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain. *Genes & development* **10**: 2067-2078.
- Gabrilovich D. 2004. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nature reviews Immunology* **4**: 941-952.
- Gabrilovich D, Ishida T, Oyama T, Ran S, Kravtsov V, Nadaf S, Carbone DP. 1998. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* **92**: 4150-4166.
- Gabrilovich DI, Bronte V, Chen SH, Colombo MP, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S, Schreiber H. 2007. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer research* **67**: 425; author reply 426.
- Gabrilovich DI, Nagaraj S. 2009. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature reviews Immunology* **9**: 162-174.
- Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. 2012. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nature reviews Immunology* **12**: 253-268.
- Gabrilovich DI, Velders MP, Sotomayor EM, Kast WM. 2001. Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *Journal of immunology* **166**: 5398-5406.
- Gallina G, Dolcetti L, Serafini P, De Santo C, Marigo I, Colombo MP, Basso G, Brombacher F, Borrello I, Zanovello P et al. 2006. Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *The Journal of clinical investigation* **116**: 2777-2790.
- Garcia MR, Ledgerwood L, Yang Y, Xu J, Lal G, Burrell B, Ma G, Hashimoto D, Li Y, Boros P et al. 2010. Monocytic suppressive cells mediate cardiovascular transplantation tolerance in mice. *The Journal of clinical investigation* **120**: 2486-2496.
- Gautier EL, Chow A, Spanbroek R, Marcelin G, Greter M, Jakubzick C, Bogunovic M, Leboeuf M, van Rooijen N, Habenicht AJ et al. 2012a. Systemic analysis of PPARgamma in mouse macrophage populations reveals marked diversity in expression with critical roles in resolution of inflammation and airway immunity. *Journal of immunology* **189**: 2614-2624.
- Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, Helft J, Chow A, Elpek KG, Gordonov S et al. 2012b. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol* **13**: 1118-1128.
- Geissmann F, Auffray C, Palframan R, Wirrig C, Ciocca A, Campisi L, Narni-Mancinelli E, Lauvau G. 2008. Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol Cell Biol* **86**: 398-408.
- Geissmann F, Jung S, Littman DR. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**: 71-82.
- Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* **327**: 656-661.
- Gelsi-Boyer V, Brecqueville M, Devillier R, Murati A, Mozziconacci MJ, Birnbaum D. 2012. Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *Journal of hematology & oncology* **5**: 12.

- Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adelaide J, Aceto N, Remy V, Pinson S, Houdayer C, Arnoulet C, Sainty D, Bentires-Alj M et al. 2008. Genome profiling of chronic myelomonocytic leukemia: frequent alterations of RAS and RUNX1 genes. *BMC cancer* **8**: 299.
- Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adelaide J, Bonansea J, Cervera N, Carbuccia N, Lagarde A, Prebet T, Nezri M, Sainty D et al. 2009. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *British journal of haematology* **145**: 788-800.
- Gemelli C, Montanari M, Tenedini E, Zanocco Marani T, Vignudelli T, Siena M, Zini R, Salati S, Tagliafico E, Manfredini R et al. 2006. Virally mediated MafB transduction induces the monocyte commitment of human CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell death and differentiation* **13**: 1686-1696.
- Gemelli C, Orlandi C, Zanocco Marani T, Martello A, Vignudelli T, Ferrari F, Montanari M, Parenti S, Testa A, Grande A et al. 2008. The vitamin D3/Hox-A10 pathway supports MafB function during the monocyte differentiation of human CD34+ hemopoietic progenitors. *Journal of immunology* **181**: 5660-5672.
- Germing U, Kundgen A, Gattermann N. 2004. Risk assessment in chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Leukemia & lymphoma* **45**: 1311-1318.
- Giallongo C, Parrinello N, Brundo MV, Raccuia SA, Di Rosa M, La Cava P, Tibullo D. 2015. Myeloid derived suppressor cells in chronic myeloid leukemia. *Frontiers in oncology* **5**: 107.
- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER et al. 2010. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* **330**: 841-845.
- Glebov OK, Rodriguez LM, Soballe P, DeNobile J, Cliatt J, Nakahara K, Kirsch IR. 2006. Gene expression patterns distinguish colonoscopically isolated human aberrant crypt foci from normal colonic mucosa. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15**: 2253-2262.
- Goddard AD, Borrow J, Freemont PS, Solomon E. 1991. Characterization of a zinc finger gene disrupted by the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia. *Science* **254**: 1371-1374.
- Goni O, Alcaide P, Fresno M. 2002. Immunosuppression during acute Trypanosoma cruzi infection: involvement of Ly6G (Gr1(+))CD11b(+)immature myeloid suppressor cells. *International immunology* **14**: 1125-1134.
- Gordon EJ, Rao S, Pollard JW, Nutt SL, Lang RA, Harvey NL. 2010. Macrophages define dermal lymphatic vessel calibre during development by regulating lymphatic endothelial cell proliferation. *Development* **137**: 3899-3910.
- Gordon S. 2008. Elie Metchnikoff: father of natural immunity. *European journal of immunology* **38**: 3257-3264.
- Gordon S, Martinez FO. 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* **32**: 593-604.
- Gordy C, Pua H, Sempowski GD, He YW. 2011. Regulation of steady-state neutrophil homeostasis by macrophages. *Blood* **117**: 618-629.
- Gorgun GT, Whitehill G, Anderson JL, Hideshima T, Maguire C, Laubach J, Raje N, Munshi NC, Richardson PG, Anderson KC. 2013. Tumor-promoting immune-suppressive myeloid-derived suppressor cells in the multiple myeloma microenvironment in humans. *Blood* **121**: 2975-2987.
- Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. 2001a. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *Journal of leukocyte biology* **69**: 11-20.

- Grage-Griebenow E, Zawatzky R, Kahlert H, Brade L, Flad H, Ernst M. 2001b. Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+) / CD16(+) blood monocytes. *European journal of immunology* **31**: 48-56.
- Grande A, Montanari M, Tagliafico E, Manfredini R, Zanocco Marani T, Siena M, Tenedini E, Gallinelli A, Ferrari S. 2002. Physiological levels of 1 α , 25 dihydroxyvitamin D3 induce the monocytic commitment of CD34+ hematopoietic progenitors. *Journal of leukocyte biology* **71**: 641-651.
- Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D et al. 1997. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* **89**: 2079-2088.
- Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Sole F, Bennett JM, Bowen D, Fenaux P, Dreyfus F et al. 2012. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* **120**: 2454-2465.
- Griffiths EA, Gore SD. 2008. DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Seminars in hematology* **45**: 23-30.
- Grossmann V, Kohlmann A, Eder C, Haferlach C, Kern W, Cross NC, Haferlach T, Schnittger S. 2011. Molecular profiling of chronic myelomonocytic leukemia reveals diverse mutations in >80% of patients with TET2 and EZH2 being of high prognostic relevance. *Leukemia* **25**: 877-879.
- Guedez L, Jensen-Taubman S, Bourboulia D, Kwityn CJ, Wei B, Caterina J, Stetler-Stevenson WG. 2012. TIMP-2 targets tumor-associated myeloid suppressor cells with effects in cancer immune dysfunction and angiogenesis. *Journal of immunotherapy* **35**: 502-512.
- Guihard S, Clay D, Cocault L, Saulnier N, Opolon P, Souyri M, Pages G, Pouyssegur J, Porteu F, Gaudry M. 2010. The MAPK ERK1 is a negative regulator of the adult steady-state splenic erythropoiesis. *Blood* **115**: 3686-3694.
- Guilliams M, De Kleer I, Henri S, Post S, Vanhoutte L, De Prijck S, Deswarte K, Malissen B, Hammad H, Lambrecht BN. 2013. Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *The Journal of experimental medicine* **210**: 1977-1992.
- Guilliams M, Ginhoux F, Jakubzick C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, Segura E, Tussiwand R, Yona S. 2014. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nature reviews Immunology* **14**: 571-578.
- Haile LA, Gamrekelashvili J, Manns MP, Korangy F, Greten TF. 2010. CD49d is a new marker for distinct myeloid-derived suppressor cell subpopulations in mice. *Journal of immunology* **185**: 203-210.
- Hakme A, Wong HK, Dantzer F, Schreiber V. 2008. The expanding field of poly(ADP-ribose)ylation reactions. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' Review Series. *EMBO reports* **9**: 1094-1100.
- Hambleton S, Salem S, Bustamante J, Bigley V, Boisson-Dupuis S, Azevedo J, Fortin A, Haniffa M, Ceron-Gutierrez L, Bacon CM et al. 2011. IRF8 mutations and human dendritic-cell immunodeficiency. *N Engl J Med* **365**: 127-138.
- Hamilton JA, Achuthan A. 2013. Colony stimulating factors and myeloid cell biology in health and disease. *Trends in immunology* **34**: 81-89.
- Hanson EM, Clements VK, Sinha P, Ilkovitch D, Ostrand-Rosenberg S. 2009. Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells. *Journal of immunology* **183**: 937-944.
- Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, Becker CD, See P, Price J, Lucas D et al. 2013. Tissue-resident macrophages self-maintain locally

- throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* **38**: 792-804.
- Hawthorn L, Stein L, Panzarella J, Loewen GM, Baumann H. 2006. Characterization of cell-type specific profiles in tissues and isolated cells from squamous cell carcinomas of the lung. *Lung Cancer* **53**: 129-142.
- He W, Dorn DC, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Moore MA, Massague J. 2006. Hematopoiesis controlled by distinct TIF1gamma and Smad4 branches of the TGFbeta pathway. *Cell* **125**: 929-941.
- Heath V, Suh HC, Holman M, Renn K, Gooya JM, Parkin S, Klarmann KD, Ortiz M, Johnson P, Keller J. 2004. C/EBPalpha deficiency results in hyperproliferation of hematopoietic progenitor cells and disrupts macrophage development in vitro and in vivo. *Blood* **104**: 1639-1647.
- Hegde SP, Zhao J, Ashmun RA, Shapiro LH. 1999. c-Maf induces monocytic differentiation and apoptosis in bipotent myeloid progenitors. *Blood* **94**: 1578-1589.
- Helgason CD, Damen JE, Rosten P, Grewal R, Sorensen P, Chappel SM, Borowski A, Jirik F, Krystal G, Humphries RK. 1998. Targeted disruption of SHIP leads to hemopoietic perturbations, lung pathology, and a shortened life span. *Genes & development* **12**: 1610-1620.
- Henkel GW, McKercher SR, Yamamoto H, Anderson KL, Oshima RG, Maki RA. 1996. PU.1 but not ets-2 is essential for macrophage development from embryonic stem cells. *Blood* **88**: 2917-2926.
- Henry CJ, Marusyk A, DeGregori J. 2011. Aging-associated changes in hematopoiesis and leukemogenesis: what's the connection? *Aging* **3**: 643-656.
- Herquel B, Ouararhni K, Khetchoumian K, Ignat M, Teletin M, Mark M, Bechade G, Van Dorsselaer A, Sanglier-Cianferani S, Hamiche A et al. 2011. Transcription cofactors TRIM24, TRIM28, and TRIM33 associate to form regulatory complexes that suppress murine hepatocellular carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 8212-8217.
- Herra CM, Keane CT, Whelan A. 1996. Increased expression of Fc gamma receptors on neutrophils and monocytes may reflect ongoing bacterial infection. *Journal of medical microbiology* **44**: 135-140.
- Hesling C, Fattet L, Teyre G, Jury D, Gonzalo P, Lopez J, Vanbelle C, Morel AP, Gillet G, Mikaelian I et al. 2011. Antagonistic regulation of EMT by TIF1gamma and Smad4 in mammary epithelial cells. *EMBO reports* **12**: 665-672.
- Hesling C, Lopez J, Fattet L, Gonzalo P, Treilleux I, Blanchard D, Losson R, Goffin V, Pigat N, Puisieux A et al. 2013. Tif1gamma is essential for the terminal differentiation of mammary alveolar epithelial cells and for lactation through SMAD4 inhibition. *Development* **140**: 167-175.
- Hettinger J, Richards DM, Hansson J, Barra MM, Joschko AC, Krijgsveld J, Feuerer M. 2013. Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat Immunol* **14**: 821-830.
- Heusinkveld M, van der Burg SH. 2011. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. *Journal of translational medicine* **9**: 216.
- Highfill SL, Rodriguez PC, Zhou Q, Goetz CA, Koehn BH, Veenstra R, Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari A, Serody JS, Munn DH et al. 2010. Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13. *Blood* **116**: 5738-5747.

- Hirai H, Zhang P, Dayaram T, Hetherington CJ, Mizuno S, Imanishi J, Akashi K, Tenen DG. 2006. C/EBPbeta is required for 'emergency' granulopoiesis. *Nat Immunol* **7**: 732-739.
- Hock BD, Mackenzie KA, Cross NB, Taylor KG, Currie MJ, Robinson BA, Simcock JW, McKenzie JL. 2012. Renal transplant recipients have elevated frequencies of circulating myeloid-derived suppressor cells. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **27**: 402-410.
- Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM, Traver D, Bronson RT, Cameron S, Orkin SH. 2003. Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation. *Immunity* **18**: 109-120.
- Hoeffel G, Wang Y, Greter M, See P, Teo P, Malleret B, Leboeuf M, Low D, Oller G, Almeida F et al. 2012. Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *The Journal of experimental medicine* **209**: 1167-1181.
- Holtzschke T, Lohler J, Kanno Y, Fehr T, Giese N, Rosenbauer F, Lou J, Knobloch KP, Gabriele L, Waring JF et al. 1996. Immunodeficiency and chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with a targeted mutation of the ICSBP gene. *Cell* **87**: 307-317.
- Horelt A, Belge KU, Steppich B, Prinz J, Ziegler-Heitbrock L. 2002. The CD14+CD16+ monocytes in erysipelas are expanded and show reduced cytokine production. *European journal of immunology* **32**: 1319-1327.
- Huang B, Pan PY, Li Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J, Divino CM, Chen SH. 2006. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer research* **66**: 1123-1131.
- Hume DA. 2012. Plenary perspective: the complexity of constitutive and inducible gene expression in mononuclear phagocytes. *Journal of leukocyte biology* **92**: 433-444.
- Ichikawa M, Williams R, Wang L, Vogl T, Srikrishna G. 2011. S100A8/A9 activate key genes and pathways in colon tumor progression. *Molecular cancer research : MCR* **9**: 133-148.
- Ikeuchi Y, Dadakhujaev S, Chandhoke AS, Huynh MA, Oldenborg A, Ikeuchi M, Deng L, Bennett EJ, Harper JW, Bonni A et al. 2014. TIF1gamma protein regulates epithelial-mesenchymal transition by operating as a small ubiquitin-like modifier (SUMO) E3 ligase for the transcriptional regulator SnoN1. *The Journal of biological chemistry* **289**: 25067-25078.
- Ingersoll MA, Spanbroek R, Lottaz C, Gautier EL, Frankenberger M, Hoffmann R, Lang R, Haniffa M, Collin M, Tacke F et al. 2010. Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* **115**: e10-19.
- Issa LL, Leong GM, Eisman JA. 1998. Molecular mechanism of vitamin D receptor action. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]* **47**: 451-475.
- Itzykson R, Kosmider O, Cluzeau T, Mansat-De Mas V, Dreyfus F, Beyne-Rauzy O, Quesnel B, Vey N, Gelsi-Boyer V, Raynaud S et al. 2011. Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. *Leukemia* **25**: 1147-1152.
- Itzykson R, Kosmider O, Renneville A, Gelsi-Boyer V, Meggendorfer M, Morabito M, Berthon C, Ades L, Fenaux P, Beyne-Rauzy O et al. 2013a. Prognostic score including gene mutations in chronic myelomonocytic leukemia. *Journal of clinical*

- oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **31**: 2428-2436.
- Itzykson R, Kosmider O, Renneville A, Morabito M, Preudhomme C, Berthon C, Ades L, Fenaux P, Platzbecker U, Gagey O et al. 2013b. Clonal architecture of chronic myelomonocytic leukemias. *Blood* **121**: 2186-2198.
- Itzykson R, Solary E. 2013. An evolutionary perspective on chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia* **27**: 1441-1450.
- Ivanov AV, Peng H, Yurchenko V, Yap KL, Negorev DG, Schultz DC, Psulkowski E, Fredericks WJ, White DE, Maul GG et al. 2007. PHD domain-mediated E3 ligase activity directs intramolecular sumoylation of an adjacent bromodomain required for gene silencing. *Molecular cell* **28**: 823-837.
- Iwasaki H, Akashi K. 2007. Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. *Immunity* **26**: 726-740.
- Iwasaki H, Somoza C, Shigematsu H, Duprez EA, Iwasaki-Arai J, Mizuno S, Arinobu Y, Geary K, Zhang P, Dayaram T et al. 2005. Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. *Blood* **106**: 1590-1600.
- Jain S, Singhal S, Francis F, Hajdu C, Wang JH, Suriawinata A, Wang YQ, Zhang M, Weinshel EH, Francois F et al. 2011. Association of overexpression of TIF1gamma with colorectal carcinogenesis and advanced colorectal adenocarcinoma. *World journal of gastroenterology : WJG* **17**: 3994-4000.
- Jakubzick C, Gautier EL, Gibbings SL, Sojka DK, Schlitzer A, Johnson TE, Ivanov S, Duan Q, Bala S, Condon T et al. 2013. Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity* **39**: 599-610.
- Jankowska AM, Makishima H, Tiu RV, Szpurka H, Huang Y, Traina F, Visconte V, Sugimoto Y, Prince C, O'Keefe C et al. 2011. Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2, and DNMT3A. *Blood* **118**: 3932-3941.
- Jankowska AM, Szpurka H, Tiu RV, Makishima H, Afable M, Huh J, O'Keefe CL, Ganetzky R, McDevitt MA, Maciejewski JP. 2009. Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* **113**: 6403-6410.
- Jaworowski A, Kamwendo DD, Ellery P, Sonza S, Mwapasa V, Tadesse E, Molyneux ME, Rogerson SJ, Meshnick SR, Crowe SM. 2007. CD16+ monocyte subset preferentially harbors HIV-1 and is expanded in pregnant Malawian women with Plasmodium falciparum malaria and HIV-1 infection. *The Journal of infectious diseases* **196**: 38-42.
- Jiao ZJ, Gao JJ, Hua SH, Chen DY, Wang WH, Wang H, Wang XH, Xu HX. 2012. Correlation between circulating myeloid-derived suppressor cells and Th17 cells in esophageal cancer. *World journal of gastroenterology : WJG* **18**: 5454-5461.
- Jingushi K, Ueda Y, Kitae K, Hase H, Egawa H, Ohshio I, Kawakami R, Kashiwagi Y, Tsukada Y, Kobayashi T et al. 2014. miRNA-629 Targets TRIM33 to Promote TGF-beta/Smad Signaling and Metastatic Phenotypes in ccRCC. *Molecular cancer research : MCR*.
- Kakizuka A, Miller WH, Jr., Umesono K, Warrell RP, Jr., Frankel SR, Murty VV, Dmitrovsky E, Evans RM. 1991. Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* **66**: 663-674.

- Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kobayashi T, Sato T, Sakuraba A, Kitazume MT, Sugita A, Koganei K et al. 2008. Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *The Journal of clinical investigation* **118**: 2269-2280.
- Kapanadze B, Kashuba V, Baranova A, Rasool O, van Everdink W, Liu Y, Syomov A, Corcoran M, Poltarau A, Brodyansky V et al. 1998. A cosmid and cDNA fine physical map of a human chromosome 13q14 region frequently lost in B-cell chronic lymphocytic leukemia and identification of a new putative tumor suppressor gene, Leu5. *FEBS Lett* **426**: 266-270.
- Kar SA, Jankowska A, Makishima H, Visconte V, Jerez A, Sugimoto Y, Muramatsu H, Traina F, Afable M, Guinta K et al. 2013. Spliceosomal gene mutations are frequent events in the diverse mutational spectrum of chronic myelomonocytic leukemia but largely absent in juvenile myelomonocytic leukemia. *Haematologica* **98**: 107-113.
- Karsunky H, Zeng H, Schmidt T, Zevnik B, Kluge R, Schmid KW, Duhrsen U, Moroy T. 2002. Inflammatory reactions and severe neutropenia in mice lacking the transcriptional repressor Gfi1. *Nature genetics* **30**: 295-300.
- Kawanaka N, Yamamura M, Aita T, Morita Y, Okamoto A, Kawashima M, Iwahashi M, Ueno A, Ohmoto Y, Makino H. 2002. CD14+,CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **46**: 2578-2586.
- Kawane K, Fukuyama H, Kondoh G, Takeda J, Ohsawa Y, Uchiyama Y, Nagata S. 2001. Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. *Science* **292**: 1546-1549.
- Keller P, Payne JL, Tremml G, Greer PA, Gaboli M, Pandolfi PP, Bessler M. 2001. FES-Cre targets phosphatidylinositol glycan class A (PIGA) inactivation to hematopoietic stem cells in the bone marrow. *The Journal of experimental medicine* **194**: 581-589.
- Khetchoumian K, Teletin M, Mark M, Lerouge T, Cervino M, Oulad-Abdelghani M, Chambon P, Losson R. 2004. TIF1delta, a novel HP1-interacting member of the transcriptional intermediary factor 1 (TIF1) family expressed by elongating spermatids. *The Journal of biological chemistry* **279**: 48329-48341.
- Khetchoumian K, Teletin M, Tisserand J, Mark M, Herquel B, Ignat M, Zucman-Rossi J, Cammas F, Lerouge T, Thibault C et al. 2007. Loss of Trim24 (Tif1alpha) gene function confers oncogenic activity to retinoic acid receptor alpha. *Nature genetics* **39**: 1500-1506.
- Kiel MJ, Morrison SJ. 2006. Maintaining hematopoietic stem cells in the vascular niche. *Immunity* **25**: 862-864.
- Kikuchi M, Okumura F, Tsukiyama T, Watanabe M, Miyajima N, Tanaka J, Imamura M, Hatakeyama S. 2009. TRIM24 mediates ligand-dependent activation of androgen receptor and is repressed by a bromodomain-containing protein, BRD7, in prostate cancer cells. *Biochimica et biophysica acta* **1793**: 1828-1836.
- Kim J, Kaartinen V. 2008. Generation of mice with a conditional allele for Trim33. *Genesis* **46**: 329-333.
- Ko JS, Zea AH, Rini BI, Ireland JL, Elson P, Cohen P, Golshayan A, Rayman PA, Wood L, Garcia J et al. 2009. Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **15**: 2148-2157.
- Kohlmann A, Grossmann V, Klein HU, Schindela S, Weiss T, Kazak B, Dicker F, Schnittger S, Dugas M, Kern W et al. 2010. Next-generation sequencing technology reveals a

- characteristic pattern of molecular mutations in 72.8% of chronic myelomonocytic leukemia by detecting frequent alterations in TET2, CBL, RAS, and RUNX1. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **28**: 3858-3865.
- Kondo A, Yamashita T, Tamura H, Zhao W, Tsuji T, Shimizu M, Shinya E, Takahashi H, Tamada K, Chen L et al. 2010. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha induce an immunoinhibitory molecule, B7-H1, via nuclear factor-kappaB activation in blasts in myelodysplastic syndromes. *Blood* **116**: 1124-1131.
- Kosaka Y, Inoue H, Ohmachi T, Yokoe T, Matsumoto T, Mimori K, Tanaka F, Watanabe M, Mori M. 2007. Tripartite motif-containing 29 (TRIM29) is a novel marker for lymph node metastasis in gastric cancer. *Ann Surg Oncol* **14**: 2543-2549.
- Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Ciudad M, Racœur C, Jooste V, Vey N, Quesnel B, Fenaux P, Bastie JN, Beyne-Rauzy O et al. 2009. TET2 gene mutation is a frequent and adverse event in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica* **94**: 1676-1681.
- Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Slama L, Dreyfus F, Beyne-Rauzy O, Quesnel B, Hunault-Berger M, Slama B, Vey N, Lacombe C et al. 2010. Mutations of IDH1 and IDH2 genes in early and accelerated phases of myelodysplastic syndromes and MDS/myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* **24**: 1094-1096.
- Kowanetz M, Wu X, Lee J, Tan M, Hagenbeek T, Qu X, Yu L, Ross J, Korsisaari N, Cao T et al. 2010. Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung metastasis through mobilization of Ly6G+Ly6C+ granulocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 21248-21255.
- Krishnaraju K, Hoffman B, Liebermann DA. 2001. Early growth response gene 1 stimulates development of hematopoietic progenitor cells along the macrophage lineage at the expense of the granulocyte and erythroid lineages. *Blood* **97**: 1298-1305.
- Krysinska H, Hoogenkamp M, Ingram R, Wilson N, Tagoh H, Laslo P, Singh H, Bonifer C. 2007. A two-step, PU.1-dependent mechanism for developmentally regulated chromatin remodeling and transcription of the c-fms gene. *Mol Cell Biol* **27**: 878-887.
- Kuang DM, Zhao Q, Peng C, Xu J, Zhang JP, Wu C, Zheng L. 2009. Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *The Journal of experimental medicine* **206**: 1327-1337.
- Kujawski M, Kortylewski M, Lee H, Herrmann A, Kay H, Yu H. 2008. Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice. *The Journal of clinical investigation* **118**: 3367-3377.
- Kulkarni A, Oza J, Yao M, Sohail H, Ginja V, Tomas-Loba A, Horejsi Z, Tan AR, Boulton SJ, Ganesan S. 2013. Tripartite Motif-containing 33 (TRIM33) protein functions in the poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)-dependent DNA damage response through interaction with Amplified in Liver Cancer 1 (ALC1) protein. *The Journal of biological chemistry* **288**: 32357-32369.
- Kuo MC, Liang DC, Huang CF, Shih YS, Wu JH, Lin TL, Shih LY. 2009. RUNX1 mutations are frequent in chronic myelomonocytic leukemia and mutations at the C-terminal region might predict acute myeloid leukemia transformation. *Leukemia* **23**: 1426-1431.
- Kurotaki D, Osato N, Nishiyama A, Yamamoto M, Ban T, Sato H, Nakabayashi J, Umehara M, Miyake N, Matsumoto N et al. 2013. Essential role of the IRF8-KLF4

- transcription factor cascade in murine monocyte differentiation. *Blood* **121**: 1839-1849.
- Kusmartsev S, Cheng F, Yu B, Nefedova Y, Sotomayor E, Lush R, Gabrilovich D. 2003. All-trans-retinoic acid eliminates immature myeloid cells from tumor-bearing mice and improves the effect of vaccination. *Cancer research* **63**: 4441-4449.
- Kusmartsev S, Nefedova Y, Yoder D, Gabrilovich DI. 2004. Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *Journal of immunology* **172**: 989-999.
- Kusmartsev S, Su Z, Heiser A, Dannull J, Eruslanov E, Kubler H, Yancey D, Dahm P, Vieweg J. 2008. Reversal of myeloid cell-mediated immunosuppression in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **14**: 8270-8278.
- Kusy S, Gault N, Ferri F, Lewandowski D, Barroca V, Jaracz-Ros A, Losson R, Romeo PH. 2011. Adult hematopoiesis is regulated by TIF1gamma, a repressor of TAL1 and PU.1 transcriptional activity. *Cell Stem Cell* **8**: 412-425.
- Lagrange B, Martin RZ, Droin N, Aucagne R, Paggetti J, Largeot A, Itzykson R, Solary E, Delva L, Bastie JN. 2013. A role for miR-142-3p in colony-stimulating factor 1-induced monocyte differentiation into macrophages. *Biochimica et biophysica acta* **1833**: 1936-1946.
- Lai TY, Wu SD, Tsai MH, Chuang EY, Chuang LL, Hsu LC, Lai LC. 2013. Transcription of Tnfaip3 is regulated by NF-kappaB and p38 via C/EBPbeta in activated macrophages. *PloS one* **8**: e73153.
- Landsman L, Varol C, Jung S. 2007. Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung. *Journal of immunology* **178**: 2000-2007.
- Lappat EJ, Cawein M. 1964. A Study of the Leukemoid Response to Transplantable a-280 Tumor in Mice. *Cancer research* **24**: 302-311.
- Lathers DM, Clark JI, Achille NJ, Young MR. 2001. Phase IB study of 25-hydroxyvitamin D(3) treatment to diminish suppressor cells in head and neck cancer patients. *Human immunology* **62**: 1282-1293.
- Le Douarin B, Nielsen AL, Garnier JM, Ichinose H, Jeanmougin F, Losson R, Chambon P. 1996. A possible involvement of TIF1 alpha and TIF1 beta in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors. *The EMBO journal* **15**: 6701-6715.
- Lee B, Qiao L, Lu M, Yoo HS, Cheung W, Mak R, Schaack J, Feng GS, Chi NW, Olefsky JM et al. 2014. C/EBPalpha regulates macrophage activation and systemic metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **306**: E1144-1154.
- Lee JM, Seo JH, Kim YJ, Kim YS, Ko HJ, Kang CY. 2012. The restoration of myeloid-derived suppressor cells as functional antigen-presenting cells by NKT cell help and all-trans-retinoic acid treatment. *International journal of cancer Journal international du cancer* **131**: 741-751.
- Lee MY, Rosse C. 1982. Depletion of lymphocyte subpopulations in primary and secondary lymphoid organs of mice by a transplanted granulocytosis-inducing mammary carcinoma. *Cancer research* **42**: 1255-1260.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**: 843-854.
- Li B, Abdalrahman A, Lai Y, Janicki JS, Ward KW, Meyer CJ, Wang XL, Tang D, Cui T. 2014a. Dihydro-CDDO-trifluoroethyl amide suppresses inflammatory responses in macrophages via activation of Nrf2. *Biochemical and biophysical research communications* **444**: 555-561.

- Li H, Han Y, Guo Q, Zhang M, Cao X. 2009. Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *Journal of immunology* **182**: 240-249.
- Li H, Wawrose JS, Gooding WE, Garraway LA, Lui VW, Peyser ND, Grandis JR. 2014b. Genomic analysis of head and neck squamous cell carcinoma cell lines and human tumors: a rational approach to preclinical model selection. *Molecular cancer research : MCR* **12**: 571-582.
- Liao X, Sharma N, Kapadia F, Zhou G, Lu Y, Hong H, Paruchuri K, Mahabeleshwar GH, Dalmas E, Venteclef N et al. 2011. Kruppel-like factor 4 regulates macrophage polarization. *The Journal of clinical investigation* **121**: 2736-2749.
- Libby P, Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK. 2008. Diversity of denizens of the atherosclerotic plaque: not all monocytes are created equal. *Circulation* **117**: 3168-3170.
- Ligr M, Wu X, Daniels G, Zhang D, Wang H, Hajdu C, Wang J, Pan R, Pei Z, Zhang L et al. 2014. Imbalanced expression of Tif1gamma inhibits pancreatic ductal epithelial cell growth. *American journal of cancer research* **4**: 196-210.
- Lin H, Lee E, Hestir K, Leo C, Huang M, Bosch E, Halenbeck R, Wu G, Zhou A, Behrens D et al. 2008. Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science* **320**: 807-811.
- Liu Q, Sasaki T, Koziaradzki I, Wakeham A, Itie A, Dumont DJ, Penninger JM. 1999. SHIP is a negative regulator of growth factor receptor-mediated PKB/Akt activation and myeloid cell survival. *Genes & development* **13**: 786-791.
- Liu Y, Lai L, Chen Q, Song Y, Xu S, Ma F, Wang X, Wang J, Yu H, Cao X et al. 2012. MicroRNA-494 is required for the accumulation and functions of tumor-expanded myeloid-derived suppressor cells via targeting of PTEN. *Journal of immunology* **188**: 5500-5510.
- Makishima H, Visconte V, Sakaguchi H, Jankowska AM, Abu Kar S, Jerez A, Przychodzen B, Bupathi M, Guinta K, Afable MG et al. 2012. Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. *Blood* **119**: 3203-3210.
- Manjili MH, Wang XY, Abrams S. 2014. Evolution of Our Understanding of Myeloid Regulatory Cells: From MDSCs to Mregs. *Frontiers in immunology* **5**: 303.
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology* **23**: 549-555.
- Marshall MA, Jankovic D, Maher VE, Sher A, Berzofsky JA. 2001. Mice infected with *Schistosoma mansoni* develop a novel non-T-lymphocyte suppressor population which inhibits virus-specific CTL induction via a soluble factor. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **3**: 1051-1061.
- Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. 2006. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *Journal of immunology* **177**: 7303-7311.
- Martinon F, Burns K, Tschopp J. 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular cell* **10**: 417-426.
- Masclé XH, Germain-Desprez D, Huynh P, Estéphan P, Aubry M. 2007. Sumoylation of the transcriptional intermediary factor 1beta (TIF1beta), the Co-repressor of the KRAB Multifinger proteins, is required for its transcriptional activity and is

- modulated by the KRAB domain. *The Journal of biological chemistry* **282**: 10190-10202.
- Matsuura E, Ishiguro N, Katsumata Y, Urano W, Yamanaka H, Kondo M, Kuwana M, Kaji K, Hamaguchi Y, Fujimoto M et al. 2012. Two young-adult female cases of dermatomyositis with antibodies for transcriptional intermediary factor 1-gamma. *European journal of dermatology : EJD* **22**: 668-671.
- Mauti LA, Le Bitoux MA, Baumer K, Stehle JC, Golshayan D, Provero P, Stamenkovic I. 2011. Myeloid-derived suppressor cells are implicated in regulating permissiveness for tumor metastasis during mouse gestation. *The Journal of clinical investigation* **121**: 2794-2807.
- Mazzieri R, Pucci F, Moi D, Zonari E, Ranghetti A, Berti A, Politi LS, Gentner B, Brown JL, Naldini L et al. 2011. Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells. *Cancer cell* **19**: 512-526.
- McKercher SR, Torbett BE, Anderson KL, Henkel GW, Vestal DJ, Baribault H, Klemsz M, Feeney AJ, Wu GE, Paige CJ et al. 1996. Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *The EMBO journal* **15**: 5647-5658.
- Meggendorfer M, Roller A, Haferlach T, Eder C, Dicker F, Grossmann V, Kohlmann A, Alpermann T, Yoshida K, Ogawa S et al. 2012. SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Blood* **120**: 3080-3088.
- Melani C, Chiodoni C, Forni G, Colombo MP. 2003. Myeloid cell expansion elicited by the progression of spontaneous mammary carcinomas in c-erbB-2 transgenic BALB/c mice suppresses immune reactivity. *Blood* **102**: 2138-2145.
- Melani C, Sangaletti S, Barazzetta FM, Werb Z, Colombo MP. 2007. Amino-biphosphonate-mediated MMP-9 inhibition breaks the tumor-bone marrow axis responsible for myeloid-derived suppressor cell expansion and macrophage infiltration in tumor stroma. *Cancer research* **67**: 11438-11446.
- Meldi K, Qin T, Buchi F, Droin N, Sotzen J, Micol JB, Selimoglu-Buet D, Masala E, Allione B, Gioia D et al. 2015. Specific molecular signatures predict decitabine response in chronic myelomonocytic leukemia. *The Journal of clinical investigation* **125**: 1857-1872.
- Mencacci A, Montagnoli C, Bacci A, Cenci E, Pitzurra L, Spreca A, Kopf M, Sharpe AH, Romani L. 2002. CD80+Gr-1+ myeloid cells inhibit development of antifungal Th1 immunity in mice with candidiasis. *Journal of immunology* **169**: 3180-3190.
- Mitoma H, Hanabuchi S, Kim T, Bao M, Zhang Z, Sugimoto N, Liu YJ. 2013. The DHX33 RNA helicase senses cytosolic RNA and activates the NLRP3 inflammasome. *Immunity* **39**: 123-135.
- Monteiro R, Pouget C, Patient R. 2011. The gata1/pu.1 lineage fate paradigm varies between blood populations and is modulated by tif1gamma. *The EMBO journal* **30**: 1093-1103.
- Morsut L, Yan KP, Enzo E, Aragona M, Soligo SM, Wendling O, Mark M, Khetchoumian K, Bressan G, Chambon P et al. 2010. Negative control of Smad activity by ectoderm/Tif1gamma patterns the mammalian embryo. *Development* **137**: 2571-2578.
- Movahedi K, Williams M, Van den Bossche J, Van den Bergh R, Gysemans C, Beschin A, De Baetselier P, Van Ginderachter JA. 2008. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* **111**: 4233-4244.

- Movahedi K, Laoui D, Gysemans C, Baeten M, Stange G, Van den Bossche J, Mack M, Pipeleers D, In't Veld P, De Baetselier P et al. 2010. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer research* **70**: 5728-5739.
- Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. 2008. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nature reviews Cancer* **8**: 618-631.
- Muro Y, Ishikawa A, Sugiura K, Akiyama M. 2012. Clinical features of anti-TIF1-alpha antibody-positive dermatomyositis patients are closely associated with coexistent dermatomyositis-specific autoantibodies and anti-TIF1-gamma or anti-Mi-2 autoantibodies. *Rheumatology* **51**: 1508-1513.
- Mutter GL, Baak JP, Fitzgerald JT, Gray R, Neuberg D, Kust GA, Gentleman R, Gullans SR, Wei LJ, Wilcox M. 2001. Global expression changes of constitutive and hormonally regulated genes during endometrial neoplastic transformation. *Gynecologic oncology* **83**: 177-185.
- Nagaraj S, Schrum AG, Cho HI, Celis E, Gabrilovich DI. 2010a. Mechanism of T cell tolerance induced by myeloid-derived suppressor cells. *Journal of immunology* **184**: 3106-3116.
- Nagaraj S, Youn JI, Weber H, Iclozan C, Lu L, Cotter MJ, Meyer C, Becerra CR, Fishman M, Antonia S et al. 2010b. Anti-inflammatory triterpenoid blocks immune suppressive function of MDSCs and improves immune response in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **16**: 1812-1823.
- Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. 2007. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *The Journal of experimental medicine* **204**: 3037-3047.
- Naik SH, Sathe P, Park HY, Metcalf D, Proietto AI, Dakic A, Carotta S, O'Keeffe M, Bahlo M, Papenfuss A et al. 2007. Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol* **8**: 1217-1226.
- Naito M, Hasegawa G, Takahashi K. 1997. Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells. *Microsc Res Tech* **39**: 350-364.
- Nandi S, Gokhan S, Dai XM, Wei S, Enikolopov G, Lin H, Mehler MF, Stanley ER. 2012. The CSF-1 receptor ligands IL-34 and CSF-1 exhibit distinct developmental brain expression patterns and regulate neural progenitor cell maintenance and maturation. *Developmental biology* **367**: 100-113.
- Nefedova Y, Cheng P, Gilkes D, Blaskovich M, Beg AA, Sebt SM, Gabrilovich DI. 2005. Activation of dendritic cells via inhibition of Jak2/STAT3 signaling. *Journal of immunology* **175**: 4338-4346.
- Nerlov C, Graf T. 1998. PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes & development* **12**: 2403-2412.
- Nguyen HQ, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA. 1993. The zinc finger transcription factor Egr-1 is essential for and restricts differentiation along the macrophage lineage. *Cell* **72**: 197-209.
- Niida S, Kaku M, Amano H, Yoshida H, Kataoka H, Nishikawa S, Tanne K, Maeda N, Nishikawa S, Kodama H. 1999. Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *The Journal of experimental medicine* **190**: 293-298.

- Noonan KA, Ghosh N, Rudraraju L, Bui M, Borrello I. 2014. Targeting immune suppression with PDE5 inhibition in end-stage multiple myeloma. *Cancer immunology research* **2**: 725-731.
- Obermajer N, Muthuswamy R, Odunsi K, Edwards RP, Kalinski P. 2011. PGE(2)-induced CXCL12 production and CXCR4 expression controls the accumulation of human MDSCs in ovarian cancer environment. *Cancer research* **71**: 7463-7470.
- Odegaard JI, Chawla A. 2013. Pleiotropic actions of insulin resistance and inflammation in metabolic homeostasis. *Science* **339**: 172-177.
- Ohnishi K, Komohara Y, Saito Y, Miyamoto Y, Watanabe M, Baba H, Takeya M. 2013. CD169-positive macrophages in regional lymph nodes are associated with a favorable prognosis in patients with colorectal carcinoma. *Cancer science* **104**: 1237-1244.
- Onai N, Obata-Onai A, Schmid MA, Ohteki T, Jarrossay D, Manz MG. 2007. Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat Immunol* **8**: 1207-1216.
- Onida F, Kantarjian HM, Smith TL, Ball G, Keating MJ, Estey EH, Glassman AB, Albitar M, Kwari MI, Beran M. 2002. Prognostic factors and scoring systems in chronic myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis of 213 patients. *Blood* **99**: 840-849.
- Orazi A, Germing U. 2008. The myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: myeloproliferative diseases with dysplastic features. *Leukemia* **22**: 1308-1319.
- Oseroff A, Okada S, Strober S. 1984. Natural suppressor (NS) cells found in the spleen of neonatal mice and adult mice given total lymphoid irradiation (TLI) express the null surface phenotype. *Journal of immunology* **132**: 101-110.
- Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. 2009. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *Journal of immunology* **182**: 4499-4506.
- Ostuni R, Kratochvill F, Murray PJ, Natoli G. 2015. Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications. *Trends in immunology* **36**: 229-239.
- Pak AS, Wright MA, Matthews JP, Collins SL, Petruzzelli GJ, Young MR. 1995. Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: presence of CD34(+) cells which suppress immune functions within cancers that secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **1**: 95-103.
- Pan PY, Wang GX, Yin B, Ozao J, Ku T, Divino CM, Chen SH. 2008. Reversion of immune tolerance in advanced malignancy: modulation of myeloid-derived suppressor cell development by blockade of stem-cell factor function. *Blood* **111**: 219-228.
- Paraiso KH, Ghansah T, Costello A, Engelman RW, Kerr WG. 2007. Induced SHIP deficiency expands myeloid regulatory cells and abrogates graft-versus-host disease. *Journal of immunology* **178**: 2893-2900.
- Parikh SA, Tefferi A. 2012. Chronic myelomonocytic leukemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management. *American journal of hematology* **87**: 610-619.
- Park YJ, Song B, Kim YS, Kim EK, Lee JM, Lee GE, Kim JO, Kim YJ, Chang WS, Kang CY. 2013. Tumor microenvironmental conversion of natural killer cells into myeloid-derived suppressor cells. *Cancer research* **73**: 5669-5681.
- Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. 1989. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* **74**: 2527-2534.

- Patnaik MM, Lasho TL, Finke CM, Hanson CA, Hodnefield JM, Knudson RA, Ketterling RP, Pardanani A, Tefferi A. 2013a. Spliceosome mutations involving SRSF2, SF3B1, and U2AF35 in chronic myelomonocytic leukemia: prevalence, clinical correlates, and prognostic relevance. *American journal of hematology* **88**: 201-206.
- Patnaik MM, Padron E, LaBorde RR, Lasho TL, Finke CM, Hanson CA, Hodnefield JM, Knudson RA, Ketterling RP, Al-kali A et al. 2013b. Mayo prognostic model for WHO-defined chronic myelomonocytic leukemia: ASXL1 and spliceosome component mutations and outcomes. *Leukemia* **27**: 1504-1510.
- Pekarek LA, Starr BA, Toledano AY, Schreiber H. 1995. Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes. *The Journal of experimental medicine* **181**: 435-440.
- Peng H, Feldman I, Rauscher FJ, 3rd. 2002. Hetero-oligomerization among the TIF family of RBCC/TRIM domain-containing nuclear cofactors: a potential mechanism for regulating the switch between coactivation and corepression. *J Mol Biol* **320**: 629-644.
- Peranzoni E, Zilio S, Marigo I, Dolcetti L, Zanovello P, Mandruzzato S, Bronte V. 2010. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Current opinion in immunology* **22**: 238-244.
- Perry JM, Harandi OF, Paulson RF. 2007. BMP4, SCF, and hypoxia cooperatively regulate the expansion of murine stress erythroid progenitors. *Blood* **109**: 4494-4502.
- Perry JM, Harandi OF, Porayette P, Hegde S, Kannan AK, Paulson RF. 2009. Maintenance of the BMP4-dependent stress erythropoiesis pathway in the murine spleen requires hedgehog signaling. *Blood* **113**: 911-918.
- Peters JM. 2006. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature reviews Molecular cell biology* **7**: 644-656.
- Phekoo KJ, Richards MA, Moller H, Schey SA, South Thames Haematology Specialist C. 2006. The incidence and outcome of myeloid malignancies in 2,112 adult patients in southeast England. *Haematologica* **91**: 1400-1404.
- Pixley FJ, Stanley ER. 2004. CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends Cell Biol* **14**: 628-638.
- Pollard JW. 2009. Trophic macrophages in development and disease. *Nature reviews Immunology* **9**: 259-270.
- Pommier RM, Gout J, Vincent DF, Alcaraz LB, Chuvin N, Arfi V, Martel S, Kaniewski B, Devailly G, Fourel G et al. 2015. TIF1-gamma Suppresses Tumor Progression by Regulating Mitotic Checkpoints and Chromosomal Stability. *Cancer research*.
- Porayette P, Paulson RF. 2008. BMP4/Smad5 dependent stress erythropoiesis is required for the expansion of erythroid progenitors during fetal development. *Developmental biology* **317**: 24-35.
- Porembka MR, Mitchem JB, Belt BA, Hsieh CS, Lee HM, Herndon J, Gillanders WE, Linehan DC, Goedegebuure P. 2012. Pancreatic adenocarcinoma induces bone marrow mobilization of myeloid-derived suppressor cells which promote primary tumor growth. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **61**: 1373-1385.
- Poschke I, Mougiakakos D, Hansson J, Masucci GV, Kiessling R. 2010. Immature immunosuppressive CD14+HLA-DR-/low cells in melanoma patients are Stat3hi and overexpress CD80, CD83, and DC-sign. *Cancer research* **70**: 4335-4345.
- Pourcet B, Pineda-Torra I. 2013. Transcriptional regulation of macrophage arginase 1 expression and its role in atherosclerosis. *Trends in cardiovascular medicine* **23**: 143-152.

- Pyonteck SM, Akkari L, Schuhmacher AJ, Bowman RL, Sevenich L, Quail DF, Olson OC, Quick ML, Huse JT, Teijeiro V et al. 2013. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nature medicine* **19**: 1264-1272.
- Qian BZ, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, Kaiser EA, Snyder LA, Pollard JW. 2011. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* **475**: 222-225.
- Qian BZ, Pollard JW. 2010. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **141**: 39-51.
- Qu P, Boelte KC, Lin PC. 2012. Negative regulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Immunological investigations* **41**: 562-580.
- Quere R, Saint-Paul L, Carmignac V, Martin RZ, Chretien ML, Largeot A, Hammann A, Pais de Barros JP, Bastie JN, Delva L. 2014. Tif1gamma regulates the TGF-beta1 receptor and promotes physiological aging of hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**: 10592-10597.
- Ramachandran IR, Martner A, Pisklakova A, Condamine T, Chase T, Vogl T, Roth J, Gabrilovich D, Nefedova Y. 2013. Myeloid-derived suppressor cells regulate growth of multiple myeloma by inhibiting T cells in bone marrow. *Journal of immunology* **190**: 3815-3823.
- Randolph GJ, Inaba K, Robbani DF, Steinman RM, Muller WA. 1999. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* **11**: 753-761.
- Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Liebman RM, Schakel K. 2002. The CD16(+) (FcgammaRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *The Journal of experimental medicine* **196**: 517-527.
- Ransom DG, Bahary N, Niss K, Traver D, Burns C, Trede NS, Paffett-Lugassy N, Saganic WJ, Lim CA, Hersey C et al. 2004. The zebrafish moonshine gene encodes transcriptional intermediary factor 1gamma, an essential regulator of hematopoiesis. *PLoS biology* **2**: E237.
- Ransom DG, Haffter P, Odenthal J, Brownlie A, Vogelsang E, Kelsh RN, Brand M, van Eeden FJ, Furutani-Seiki M, Granato M et al. 1996. Characterization of zebrafish mutants with defects in embryonic hematopoiesis. *Development* **123**: 311-319.
- Rao S, Lobov IB, Vallance JE, Tsujikawa K, Shiojima I, Akunuru S, Walsh K, Benjamin LE, Lang RA. 2007. Obligatory participation of macrophages in an angiopoietin 2-mediated cell death switch. *Development* **134**: 4449-4458.
- Rashid OM, Nagahashi M, Ramachandran S, Graham L, Yamada A, Spiegel S, Bear HD, Takabe K. 2013. Resection of the primary tumor improves survival in metastatic breast cancer by reducing overall tumor burden. *Surgery* **153**: 771-778.
- Ravi V, Wang WL, Lewis VO. 2011. Treatment of tenosynovial giant cell tumor and pigmented villonodular synovitis. *Current opinion in oncology* **23**: 361-366.
- Reddy MA, Yang BS, Yue X, Barnett CJ, Ross IL, Sweet MJ, Hume DA, Ostrowski MC. 1994. Opposing actions of c-ets/PU.1 and c-myb protooncogene products in regulating the macrophage-specific promoters of the human and mouse colony-stimulating factor-1 receptor (c-fms) genes. *The Journal of experimental medicine* **180**: 2309-2319.
- Reymond A, Meroni G, Fantozzi A, Merla G, Cairo S, Luzi L, Riganeli D, Zanaria E, Messali S, Cainarca S et al. 2001. The tripartite motif family identifies cell compartments. *The EMBO journal* **20**: 2140-2151.

- Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, Witztum JL, Auwerx J, Palinski W, Glass CK. 1998. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 7614-7619.
- Rieber N, Gille C, Kostlin N, Schafer I, Spring B, Ost M, Spieles H, Kugel HA, Pfeiffer M, Heininger V et al. 2013. Neutrophilic myeloid-derived suppressor cells in cord blood modulate innate and adaptive immune responses. *Clinical and experimental immunology* **174**: 45-52.
- Ries CH, Cannarile MA, Hoves S, Benz J, Wartha K, Runza V, Rey-Giraud F, Pradel LP, Feuerhake F, Klaman I et al. 2014. Targeting tumor-associated macrophages with anti-CSF-1R antibody reveals a strategy for cancer therapy. *Cancer cell* **25**: 846-859.
- Rodriguez PC, Ernstoff MS, Hernandez C, Atkins M, Zabaleta J, Sierra R, Ochoa AC. 2009. Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer research* **69**: 1553-1560.
- Rodriguez PC, Hernandez CP, Quiceno D, Dubinett SM, Zabaleta J, Ochoa JB, Gilbert J, Ochoa AC. 2005. Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *The Journal of experimental medicine* **202**: 931-939.
- Rodriguez PC, Quiceno DG, Ochoa AC. 2007. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood* **109**: 1568-1573.
- Rodriguez PC, Quiceno DG, Zabaleta J, Ortiz B, Zea AH, Piazuelo MB, Delgado A, Correa P, Brayer J, Sotomayor EM et al. 2004. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer research* **64**: 5839-5849.
- Romano A, Parrinello NL, Vetro C, Forte S, Chiarenza A, Figuera A, Motta G, Palumbo GA, Ippolito M, Consoli U et al. 2015. Circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical outcome in Hodgkin Lymphoma patients treated up-front with a risk-adapted strategy. *British journal of haematology* **168**: 689-700.
- Rossi DJ, Bryder D, Zahn JM, Ahlenius H, Sonu R, Wagers AJ, Weissman IL. 2005. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 9194-9199.
- Roth F, De La Fuente AC, Vella JL, Zoso A, Inverardi L, Serafini P. 2012. Aptamer-mediated blockade of IL4Ralpha triggers apoptosis of MDSCs and limits tumor progression. *Cancer research* **72**: 1373-1383.
- Salvadori S, Martinelli G, Zier K. 2000. Resection of solid tumors reverses T cell defects and restores protective immunity. *Journal of immunology* **164**: 2214-2220.
- Santin AD, Zhan F, Bellone S, Palmieri M, Cane S, Bignotti E, Anfossi S, Gokden M, Dunn D, Roman JJ et al. 2004. Gene expression profiles in primary ovarian serous papillary tumors and normal ovarian epithelium: identification of candidate molecular markers for ovarian cancer diagnosis and therapy. *International journal of cancer Journal international du cancer* **112**: 14-25.
- Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CW. 2006. NK cells and human pregnancy--an inflammatory view. *Trends in immunology* **27**: 399-404.
- Sarrazin S, Mossadegh-Keller N, Fukao T, Aziz A, Mourcin F, Vanhille L, Kelly Modis L, Kastner P, Chan S, Duprez E et al. 2009. MafB restricts M-CSF-dependent myeloid commitment divisions of hematopoietic stem cells. *Cell* **138**: 300-313.
- Satoh MS, Lindahl T. 1992. Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature* **356**: 356-358.

- Sawanobori Y, Ueha S, Kurachi M, Shimaoka T, Talmadge JE, Abe J, Shono Y, Kitabatake M, Kakimi K, Mukaida N et al. 2008. Chemokine-mediated rapid turnover of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Blood* **111**: 5457-5466.
- Sawant A, Ponnazhagan S. 2013. Myeloid-derived suppressor cells as a novel target for the control of osteolytic bone disease. *Oncoimmunology* **2**: e24064.
- Scheller M, Foerster J, Heyworth CM, Waring JF, Lohler J, Gilmore GL, Shadduck RK, Dexter TM, Horak I. 1999. Altered development and cytokine responses of myeloid progenitors in the absence of transcription factor, interferon consensus sequence binding protein. *Blood* **94**: 3764-3771.
- Schlitt A, Heine GH, Blankenberg S, Espinola-Klein C, Dopheide JF, Bickel C, Lackner KJ, Iz M, Meyer J, Darius H et al. 2004. CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels. *Thrombosis and haemostasis* **92**: 419-424.
- Schmierer B, Hill CS. 2007. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nature reviews Molecular cell biology* **8**: 970-982.
- Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen SE, Pollard JW et al. 2012. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* **336**: 86-90.
- Scott EW, Simon MC, Anastasi J, Singh H. 1994. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* **265**: 1573-1577.
- Sedgwick GG, Townsend K, Martin A, Shimwell NJ, Grand RJ, Stewart GS, Nilsson J, Turnell AS. 2013. Transcriptional intermediary factor 1gamma binds to the anaphase-promoting complex/cyclosome and promotes mitosis. *Oncogene* **32**: 4622-4633.
- Segaliny AI, Brion R, Brulin B, Maillason M, Charrier C, Teletchea S, Heymann D. 2015. IL-34 and M-CSF form a novel heteromeric cytokine and regulate the M-CSF receptor activation and localization. *Cytokine*.
- Selimoglu-Buet D, Wagner-Ballon O, Saada V, Bardet V, Itzykson R, Bencheikh L, Morabito M, Met E, Debord C, Benayoun E et al. 2015. Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*.
- Seo SU, Kwon HJ, Ko HJ, Byun YH, Seong BL, Uematsu S, Akira S, Kweon MN. 2011. Type I interferon signaling regulates Ly6C(hi) monocytes and neutrophils during acute viral pneumonia in mice. *PLoS Pathog* **7**: e1001304.
- Serafini P, Borrello I, Bronte V. 2006. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Seminars in cancer biology* **16**: 53-65.
- Serafini P, Mgebroff S, Noonan K, Borrello I. 2008. Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer research* **68**: 5439-5449.
- Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. 2008. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annual review of immunology* **26**: 421-452.
- Serbina NV, Kuziel W, Flavell R, Akira S, Rollins B, Pamer EG. 2003a. Sequential MyD88-independent and -dependent activation of innate immune responses to intracellular bacterial infection. *Immunity* **19**: 891-901.
- Serbina NV, Pamer EG. 2006. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nature immunology* **7**: 311-317.

- Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG. 2003b. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* **19**: 59-70.
- Shand FH, Ueha S, Otsuji M, Koid SS, Shichino S, Tsukui T, Kosugi-Kanaya M, Abe J, Tomura M, Ziogas J et al. 2014. Tracking of intertissue migration reveals the origins of tumor-infiltrating monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**: 7771-7776.
- Shojaei F, Wu X, Malik AK, Zhong C, Baldwin ME, Schanz S, Fuh G, Gerber HP, Ferrara N. 2007. Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells. *Nature biotechnology* **25**: 911-920.
- Shojaei F, Wu X, Qu X, Kowanetz M, Yu L, Tan M, Meng YG, Ferrara N. 2009. G-CSF-initiated myeloid cell mobilization and angiogenesis mediate tumor refractoriness to anti-VEGF therapy in mouse models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 6742-6747.
- Short KM, Cox TC. 2006. Subclassification of the RBCC/TRIM superfamily reveals a novel motif necessary for microtubule binding. *The Journal of biological chemistry* **281**: 8970-8980.
- Sica A, Bronte V. 2007. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *The Journal of clinical investigation* **117**: 1155-1166.
- Sieweke MH, Tekotte H, Frampton J, Graf T. 1996. MafB is an interaction partner and repressor of Ets-1 that inhibits erythroid differentiation. *Cell* **85**: 49-60.
- Simons BD, Clevers H. 2011. Strategies for homeostatic stem cell self-renewal in adult tissues. *Cell* **145**: 851-862.
- Sinha P, Clements VK, Bunt SK, Albelda SM, Ostrand-Rosenberg S. 2007a. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *Journal of immunology* **179**: 977-983.
- Sinha P, Clements VK, Fulton AM, Ostrand-Rosenberg S. 2007b. Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer research* **67**: 4507-4513.
- Sinha P, Okoro C, Foell D, Freeze HH, Ostrand-Rosenberg S, Srikrishna G. 2008. Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *Journal of immunology* **181**: 4666-4675.
- Sippel TR, White J, Nag K, Tsvankin V, Klaassen M, Kleinschmidt-DeMasters BK, Waziri A. 2011. Neutrophil degranulation and immunosuppression in patients with GBM: restoration of cellular immune function by targeting arginase I. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**: 6992-7002.
- Smith AE, Mohamedali AM, Kulasekararaj A, Lim Z, Gaken J, Lea NC, Przychodzen B, Mian SA, Nasser EE, Shooter C et al. 2010. Next-generation sequencing of the TET2 gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value. *Blood* **116**: 3923-3932.
- Socolovsky M. 2007. Molecular insights into stress erythropoiesis. *Current opinion in hematology* **14**: 215-224.
- Solheim JC, Reber AJ, Ashour AE, Robinson S, Futakuchi M, Kurz SG, Hood K, Fields RR, Shafer LR, Cornell D et al. 2007. Spleen but not tumor infiltration by dendritic and T cells is increased by intravenous adenovirus-Flt3 ligand injection. *Cancer gene therapy* **14**: 364-371.
- Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. 1988. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* **241**: 58-62.

- Squadrito ML, De Palma M. 2011. Macrophage regulation of tumor angiogenesis: implications for cancer therapy. *Mol Aspects Med* **32**: 123-145.
- Srivastava MK, Sinha P, Clements VK, Rodriguez P, Ostrand-Rosenberg S. 2010. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer research* **70**: 68-77.
- Stefater JA, 3rd, Lewkowich I, Rao S, Mariggi G, Carpenter AC, Burr AR, Fan J, Ajima R, Molkentin JD, Williams BO et al. 2011. Regulation of angiogenesis by a non-canonical Wnt-Flt1 pathway in myeloid cells. *Nature* **474**: 511-515.
- Steinman RM, Cohn ZA. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine* **137**: 1142-1162.
- Steinman RM, Witmer MD. 1978. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**: 5132-5136.
- Strauss-Ayali D, Conrad SM, Mosser DM. 2007. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *Journal of leukocyte biology* **82**: 244-252.
- Subramanian A, Hegde S, Porayette P, Yon M, Hankey P, Paulson RF. 2008. Friend virus utilizes the BMP4-dependent stress erythropoiesis pathway to induce erythroleukemia. *Journal of virology* **82**: 382-393.
- Such E, Cervera J, Costa D, Sole F, Vallespi T, Luno E, Collado R, Calasanz MJ, Hernandez-Rivas JM, Cigudosa JC et al. 2011. Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica* **96**: 375-383.
- Such E, Germing U, Malcovati L, Cervera J, Kuendgen A, Della Porta MG, Nomdedeu B, Arenillas L, Luno E, Xicoy B et al. 2013. Development and validation of a prognostic scoring system for patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* **121**: 3005-3015.
- Sudo K, Ema H, Morita Y, Nakauchi H. 2000. Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *The Journal of experimental medicine* **192**: 1273-1280.
- Sunderkotter C, Nikolic T, Dillon MJ, Van Rooijen N, Stehling M, Drevets DA, Leenen PJ. 2004. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *Journal of immunology* **172**: 4410-4417.
- Suzuki E, Kapoor V, Jassar AS, Kaiser LR, Albelda SM. 2005. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **11**: 6713-6721.
- Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, Figueiredo JL, Kohler RH, Chudnovskiy A, Waterman P et al. 2009. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* **325**: 612-616.
- Szanto A, Balint BL, Nagy ZS, Barta E, Dezso B, Pap A, Szeles L, Poliska S, Oros M, Evans RM et al. 2010. STAT6 transcription factor is a facilitator of the nuclear receptor PPARgamma-regulated gene expression in macrophages and dendritic cells. *Immunity* **33**: 699-712.
- Tacke F, Kurts C. 2011. Infiltrating monocytes versus resident Kupffer cells: do alternatively activated macrophages need to be targeted alternatively? *Hepatology* **54**: 2267-2270.
- Tagliafico E, Tenedini E, Bergamaschi A, Manfredini R, Percudani R, Siena M, Zanocco-Marani T, Grande A, Montanari M, Gemelli C et al. 2002. Gene expression profile

- of Vitamin D3 treated HL60 cells shows an incomplete molecular phenotypic conversion to monocytes. *Cell death and differentiation* **9**: 1185-1195.
- Takahashi M, Ritz J, Cooper GM. 1985. Activation of a novel human transforming gene, *ret*, by DNA rearrangement. *Cell* **42**: 581-588.
- Talmadge JE, Gabrilovich DI. 2013. History of myeloid-derived suppressor cells. *Nature reviews Cancer* **13**: 739-752.
- Tamoutounour S, Williams M, Montanana Sanchis F, Liu H, Terhorst D, Malosse C, Pollet E, Ardouin L, Luche H, Sanchez C et al. 2013. Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity* **39**: 925-938.
- Tamura T, Nagamura-Inoue T, Shmeltzer Z, Kuwata T, Ozato K. 2000. ICSBP directs bipotential myeloid progenitor cells to differentiate into mature macrophages. *Immunity* **13**: 155-165.
- Tang G, Zhang L, Fu B, Hu J, Lu X, Hu S, Patel A, Goswami M, Khoury JD, Garcia-Manero G et al. 2014. Cytogenetic risk stratification of 417 patients with chronic myelomonocytic leukemia from a single institution. *American journal of hematology* **89**: 813-818.
- Tavor S, Vuong PT, Park DJ, Gombart AF, Cohen AH, Koeffler HP. 2002. Macrophage functional maturation and cytokine production are impaired in C/EBP epsilon-deficient mice. *Blood* **99**: 1794-1801.
- Terabe M, Matsui S, Park JM, Mamura M, Noben-Trauth N, Donaldson DD, Chen W, Wahl SM, Ledbetter S, Pratt B et al. 2003. Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *The Journal of experimental medicine* **198**: 1741-1752.
- Tezel GG, Uner A, Yildiz I, Guler G, Takahashi M. 2009. RET finger protein expression in invasive breast carcinoma: relationship between RFP and ErbB2 expression. *Pathol Res Pract* **205**: 403-408.
- Thieblemont N, Weiss L, Sadeghi HM, Estcourt C, Haeffner-Cavaillon N. 1995. CD14^{low}CD16^{high}: a cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection. *European journal of immunology* **25**: 3418-3424.
- Thiery JP. 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature reviews Cancer* **2**: 442-454.
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**: 871-890.
- Thimmulappa RK, Fuchs RJ, Malhotra D, Scollick C, Traore K, Bream JH, Trush MA, Liby KT, Sporn MB, Kensler TW et al. 2007. Preclinical evaluation of targeting the Nrf2 pathway by triterpenoids (CDDO-Im and CDDO-Me) for protection from LPS-induced inflammatory response and reactive oxygen species in human peripheral blood mononuclear cells and neutrophils. *Antioxidants & redox signaling* **9**: 1963-1970.
- Till JE, Mc CE. 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* **14**: 213-222.
- Tillmanns S, Otto C, Jaffray E, Du Roure C, Bakri Y, Vanhille L, Sarrazin S, Hay RT, Sieweke MH. 2007. SUMO modification regulates MafB-driven macrophage differentiation by enabling Myb-dependent transcriptional repression. *Mol Cell Biol* **27**: 5554-5564.

- Toh B, Wang X, Keeble J, Sim WJ, Khoo K, Wong WC, Kato M, Prevost-Blondel A, Thiery JP, Abastado JP. 2011. Mesenchymal transition and dissemination of cancer cells is driven by myeloid-derived suppressor cells infiltrating the primary tumor. *PLoS biology* **9**: e1001162.
- Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. 1998. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* **93**: 241-252.
- Traina F, Visconte V, Elson P, Tabarrokhi A, Jankowska AM, Hasrouni E, Sugimoto Y, Szpurka H, Makishima H, O'Keefe CL et al. 2014. Impact of molecular mutations on treatment response to DNMT inhibitors in myelodysplasia and related neoplasms. *Leukemia* **28**: 78-87.
- Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, Mack M, Charo IF. 2007. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *The Journal of clinical investigation* **117**: 902-909.
- Tsuchiya Y, Igarashi M, Suzuki R, Kumagai K. 1988. Production of colony-stimulating factor by tumor cells and the factor-mediated induction of suppressor cells. *Journal of immunology* **141**: 699-708.
- Tsujimura H, Tamura T, Ozato K. 2003. Cutting edge: IFN consensus sequence binding protein/IFN regulatory factor 8 drives the development of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells. *Journal of immunology* **170**: 1131-1135.
- Ugel S, Delpozzo F, Desantis G, Papalini F, Simonato F, Sonda N, Zilio S, Bronte V. 2009. Therapeutic targeting of myeloid-derived suppressor cells. *Current opinion in pharmacology* **9**: 470-481.
- Valenta T, Hausmann G, Basler K. 2012. The many faces and functions of beta-catenin. *The EMBO journal* **31**: 2714-2736.
- van Furth R. 1980. The mononuclear phagocyte system. *Verh Dtsch Ges Pathol* **64**: 1-11.
- van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL. 1972. [Mononuclear phagocytic system: new classification of macrophages, monocytes and of their cell line]. *Bull World Health Organ* **47**: 651-658.
- Vardiman JW. 2010. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chemico-biological interactions* **184**: 16-20.
- Varol C, Landsman L, Fogg DK, Greenshtein L, Gildor B, Margalit R, Kalchenko V, Geissmann F, Jung S. 2007. Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* **204**: 171-180.
- Vasquez-Dunddel D, Pan F, Zeng Q, Gorbounov M, Albesiano E, Fu J, Blosser RL, Tam AJ, Bruno T, Zhang H et al. 2013. STAT3 regulates arginase-I in myeloid-derived suppressor cells from cancer patients. *The Journal of clinical investigation* **123**: 1580-1589.
- Veltman JD, Lambers ME, van Nimwegen M, Hendriks RW, Hoogsteden HC, Aerts JG, Hegmans JP. 2010. COX-2 inhibition improves immunotherapy and is associated with decreased numbers of myeloid-derived suppressor cells in mesothelioma. Celecoxib influences MDSC function. *BMC cancer* **10**: 464.
- Venturini L, You J, Stadler M, Galien R, Lallemand V, Koken MH, Mattei MG, Ganser A, Chambon P, Losson R et al. 1999. TIF1gamma, a novel member of the transcriptional intermediary factor 1 family. *Oncogene* **18**: 1209-1217.
- Verschoor CP, Johnstone J, Millar J, Dorrington MG, Habibagahi M, Lelic A, Loeb M, Bramson JL, Bowdish DM. 2013. Blood CD33(+)HLA-DR(-) myeloid-derived

- suppressor cells are increased with age and a history of cancer. *Journal of leukocyte biology* **93**: 633-637.
- Vincent DF, Yan KP, Treilleux I, Gay F, Arfi V, Kaniewski B, Marie JC, Lepinasse F, Martel S, Goddard-Leon S et al. 2009. Inactivation of TIF1gamma cooperates with Kras to induce cystic tumors of the pancreas. *PLoS Genet* **5**: e1000575.
- Vincent J, Mignot G, Chalmin F, Ladoire S, Bruchard M, Chevriaux A, Martin F, Apetoh L, Rebe C, Ghiringhelli F. 2010. 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer research* **70**: 3052-3061.
- Vincent SR, Kwasnicka DA, Fretier P. 2000. A novel RING finger-B box-coiled-coil protein, GERP. *Biochemical and biophysical research communications* **279**: 482-486.
- Virtuoso LP, Harden JL, Sotomayor P, Sigurdson WJ, Yoshimura F, Egilmez NK, Minev B, Kilinc MO. 2012. Characterization of iNOS(+) Neutrophil-like ring cell in tumor-bearing mice. *Journal of translational medicine* **10**: 152.
- vom Baur E, Zechel C, Heery D, Heine MJ, Garnier JM, Vivat V, Le Douarin B, Gronemeyer H, Chambon P, Losson R. 1996. Differential ligand-dependent interactions between the AF-2 activating domain of nuclear receptors and the putative transcriptional intermediary factors mSUG1 and TIF1. *The EMBO journal* **15**: 110-124.
- Waight JD, Hu Q, Miller A, Liu S, Abrams SI. 2011. Tumor-derived G-CSF facilitates neoplastic growth through a granulocytic myeloid-derived suppressor cell-dependent mechanism. *PloS one* **6**: e27690.
- Waight JD, Netherby C, Hensen ML, Miller A, Hu Q, Liu S, Bogner PN, Farren MR, Lee KP, Liu K et al. 2013. Myeloid-derived suppressor cell development is regulated by a STAT/IRF-8 axis. *The Journal of clinical investigation* **123**: 4464-4478.
- Walsh JC, DeKoter RP, Lee HJ, Smith ED, Lancki DW, Gurish MF, Friend DS, Stevens RL, Anastasi J, Singh H. 2002. Cooperative and antagonistic interplay between PU.1 and GATA-2 in the specification of myeloid cell fates. *Immunity* **17**: 665-676.
- Walsh JE, Clark AM, Day TA, Gillespie MB, Young MR. 2010. Use of alpha,25-dihydroxyvitamin D3 treatment to stimulate immune infiltration into head and neck squamous cell carcinoma. *Human immunology* **71**: 659-665.
- Wang E, Kawaoka S, Roe JS, Shi J, Hohmann AF, Xu Y, Bhagwat AS, Suzuki Y, Kinney JB, Vakoc CR. 2015. The transcriptional cofactor TRIM33 prevents apoptosis in B lymphoblastic leukemia by deactivating a single enhancer. *eLife* **4**.
- Wang L, Chang EW, Wong SC, Ong SM, Chong DQ, Ling KL. 2013. Increased myeloid-derived suppressor cells in gastric cancer correlate with cancer stage and plasma S100A8/A9 proinflammatory proteins. *Journal of immunology* **190**: 794-804.
- Wang YY, Zhe H, Zhao R. 2014. Preclinical evidences toward the use of triterpenoid CDDO-Me for solid cancer prevention and treatment. *Molecular cancer* **13**: 30.
- Wattel E, Guerci A, Hecquet B, Economopoulos T, Copplestone A, Mahe B, Couteaux ME, Resegotti L, Voglova V, Foussard C et al. 1996. A randomized trial of hydroxyurea versus VP16 in adult chronic myelomonocytic leukemia. Groupe Francais des Myelodysplasies and European CMML Group. *Blood* **88**: 2480-2487.
- Weiner RS, Mason RR. 1984. Subfractionation of human blood monocyte subsets with Percoll. *Experimental hematology* **12**: 800-804.
- Weissman IL. 2000. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* **100**: 157-168.

- Weng L, Mitoma H, Trichot C, Bao M, Liu Y, Zhang Z, Liu YJ. 2014. The E3 ubiquitin ligase tripartite motif 33 is essential for cytosolic RNA-induced NLRP3 inflammasome activation. *Journal of immunology* **193**: 3676-3682.
- West RB, Rubin BP, Miller MA, Subramanian S, Kaygusuz G, Montgomery K, Zhu S, Marinelli RJ, De Luca A, Downs-Kelly E et al. 2006. A landscape effect in tenosynovial giant-cell tumor from activation of CSF1 expression by a translocation in a minority of tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 690-695.
- Wijermans PW, Ruter B, Baer MR, Slack JL, Saba HI, Lubbert M. 2008. Efficacy of decitabine in the treatment of patients with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Leukemia research* **32**: 587-591.
- Williams MJ. 2007. Drosophila hemopoiesis and cellular immunity. *Journal of immunology* **178**: 4711-4716.
- Wong N, Lai P, Pang E, Leung TW, Lau JW, Johnson PJ. 2000. A comprehensive karyotypic study on human hepatocellular carcinoma by spectral karyotyping. *Hepatology* **32**: 1060-1068.
- Xi Q, Wang Z, Zaromytidou AI, Zhang XH, Chow-Tsang LF, Liu JX, Kim H, Barlas A, Manova-Todorova K, Kaartinen V et al. 2011. A poised chromatin platform for TGF-beta access to master regulators. *Cell* **147**: 1511-1524.
- Xin H, Zhang C, Herrmann A, Du Y, Figlin R, Yu H. 2009. Sunitinib inhibition of Stat3 induces renal cell carcinoma tumor cell apoptosis and reduces immunosuppressive cells. *Cancer research* **69**: 2506-2513.
- Xue J, Chen Y, Wu Y, Wang Z, Zhou A, Zhang S, Lin K, Aldape K, Majumder S, Lu Z et al. 2015. Tumour suppressor TRIM33 targets nuclear beta-catenin degradation. *Nature communications* **6**: 6156.
- Yamanaka R, Barlow C, Lekstrom-Himes J, Castilla LH, Liu PP, Eckhaus M, Decker T, Wynshaw-Boris A, Xanthopoulos KG. 1997. Impaired granulopoiesis, myelodysplasia, and early lethality in CCAAT/enhancer binding protein epsilon-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 13187-13192.
- Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi S, Eto K, Ema H, Nakauchi H. 2009. TGF-beta as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation. *Blood* **113**: 1250-1256.
- Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi S, Morita Y, Eto K, Ema H, Nakauchi H. 2006. Cytokine signals modulated via lipid rafts mimic niche signals and induce hibernation in hematopoietic stem cells. *The EMBO journal* **25**: 3515-3523.
- Yan KP, Dolle P, Mark M, Lerouge T, Wendling O, Chambon P, Losson R. 2004. Molecular cloning, genomic structure, and expression analysis of the mouse transcriptional intermediary factor 1 gamma gene. *Gene* **334**: 3-13.
- Yang L, Huang J, Ren X, Gorska AE, Chytil A, Aakre M, Carbone DP, Matrisian LM, Richmond A, Lin PC et al. 2008. Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis. *Cancer cell* **13**: 23-35.
- Yasaka T, Mantich NM, Boxer LA, Baehner RL. 1981. Functions of human monocyte and lymphocyte subsets obtained by countercurrent centrifugal elutriation: differing functional capacities of human monocyte subsets. *Journal of immunology* **127**: 1515-1518.

- Yokoe T, Toiyama Y, Okugawa Y, Tanaka K, Ohi M, Inoue Y, Mohri Y, Miki C, Kusunoki M. 2010. KAP1 is associated with peritoneal carcinomatosis in gastric cancer. *Ann Surg Oncol* **17**: 821-828.
- Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M et al. 2011. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* **478**: 64-69.
- Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, Hagiwara T, Takubo K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Matsuoka S, Miyamoto K et al. 2007. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell* **1**: 685-697.
- Youn JI, Kumar V, Collazo M, Nefedova Y, Condamine T, Cheng P, Villagra A, Antonia S, McCaffrey JC, Fishman M et al. 2013. Epigenetic silencing of retinoblastoma gene regulates pathologic differentiation of myeloid cells in cancer. *Nature immunology* **14**: 211-220.
- Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. 2008. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Journal of immunology* **181**: 5791-5802.
- Young MR, Wright MA. 1992. Myelopoiesis-associated immune suppressor cells in mice bearing metastatic Lewis lung carcinoma tumors: gamma interferon plus tumor necrosis factor alpha synergistically reduces immune suppressor and tumor growth-promoting activities of bone marrow cells and diminishes tumor recurrence and metastasis. *Cancer research* **52**: 6335-6340.
- Young MR, Wright MA, Young ME. 1991. Antibodies to colony-stimulating factors block Lewis lung carcinoma cell stimulation of immune-suppressive bone marrow cells. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **33**: 146-152.
- Younos IH, Dafferner AJ, Gulen D, Britton HC, Talmadge JE. 2012. Tumor regulation of myeloid-derived suppressor cell proliferation and trafficking. *International immunopharmacology* **13**: 245-256.
- Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, Winter P, Marell RR, Fliser D, Heine GH. 2011. SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* **118**: e50-61.
- Zhan F, Hardin J, Kordsmeier B, Bumm K, Zheng M, Tian E, Sanderson R, Yang Y, Wilson C, Zangari M et al. 2002. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood* **99**: 1745-1757.
- Zhang H, Nguyen-Jackson H, Panopoulos AD, Li HS, Murray PJ, Watowich SS. 2010. STAT3 controls myeloid progenitor growth during emergency granulopoiesis. *Blood* **116**: 2462-2471.
- Zhang Y, Liu Q, Zhang M, Yu Y, Liu X, Cao X. 2009. Fas signal promotes lung cancer growth by recruiting myeloid-derived suppressor cells via cancer cell-derived PGE2. *Journal of immunology* **182**: 3801-3808.
- Zhao F, Hoechst B, Duffy A, Gamrekelashvili J, Fioravanti S, Manns MP, Greten TF, Korangy F. 2012. S100A9 a new marker for monocytic human myeloid-derived suppressor cells. *Immunology* **136**: 176-183.
- Zhong S, Delva L, Rachez C, Cenciarelli C, Gandini D, Zhang H, Kalantry S, Freedman LP, Pandolfi PP. 1999. A RA-dependent, tumour-growth suppressive transcription complex is the target of the PML-RARalpha and T18 oncoproteins. *Nature genetics* **23**: 287-295.

- Zhuang J, Zhang J, Lwin ST, Edwards JR, Edwards CM, Mundy GR, Yang X. 2012. Osteoclasts in multiple myeloma are derived from Gr-1+CD11b+myeloid-derived suppressor cells. *PloS one* **7**: e48871.
- Ziegler-Heitbrock HW. 2000. Definition of human blood monocytes. *Journal of leukocyte biology* **67**: 603-606.
- Ziegler-Heitbrock HW, Strobel M, Kieper D, Fingerle G, Schlunck T, Petersmann I, Ellwart J, Blumenstein M, Haas JG. 1992. Differential expression of cytokines in human blood monocyte subpopulations. *Blood* **79**: 503-511.
- Zimmermann HW, Seidler S, Nattermann J, Gassler N, Hellerbrand C, Zerneck A, Tischendorf JJ, Luedde T, Weiskirchen R, Trautwein C et al. 2010. Functional contribution of elevated circulating and hepatic non-classical CD14CD16 monocytes to inflammation and human liver fibrosis. *PloS one* **5**: e11049.