



HAL
open science

Mécanismes de la leucémogénèse basophile induite par la translocation X;6 avec fusion MYB-GATA1

Stéphane Ducassou

► **To cite this version:**

Stéphane Ducassou. Mécanismes de la leucémogénèse basophile induite par la translocation X;6 avec fusion MYB-GATA1. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0170 . tel-01511466

HAL Id: tel-01511466

<https://theses.hal.science/tel-01511466>

Submitted on 21 Apr 2017

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.

Université de Bordeaux
Ecole doctorale Science Vie et Santé

THESE

Pour l'obtention du diplôme de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX
SPECIALITE : Biologie Cellulaire et physiopathologie

Présentée et soutenue publiquement le 29/11/2016
par
Stéphane DUCASSOU

MECANISME DE LA LEUCEMOGENESE BASOPHILE INDUITE PAR LA TRANSLOCATION X;6 AVEC FUSION MYB-GATA1

Directeur de thèse: Pr François Xavier MAHON

Membres du Jury

Pr André BARUCHEL
Dr Guy LEVERGER
Pr Eric DELABESSE
Pr Yves PEREL
Pr Eric LIPPERT

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Membre invité

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Yves Perel pour la confiance qu'il m'a accordée depuis mon arrivée sur Bordeaux. Vous m'avez toujours soutenu. Je vous remercie de ces nombreuses discussions dans votre bureau dont la porte m'a toujours été ouverte. Ces échanges ont été essentiels durant ces trois dernières années.

Je remercie le Professeur François Xavier Mahon de m'avoir accueilli dans son équipe et de m'avoir donné son approbation et ses encouragements pour effectuer cette thèse.

Je remercie les Professeurs Eric Delabesse et Guy Leverger d'avoir accepté de donner de leur temps pour juger ce travail. Je vous remercie aussi pour toutes vos remarques qui ont permis d'améliorer ce manuscrit.

Je remercie le Professeur André Baruchel de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury.

Je remercie le professeur Lippert de m'avoir encadré dès le début de ce travail et de m'avoir appris la rigueur scientifique. Je vous remercie également de votre disponibilité et de votre exigence qui m'a poussé à avancer à chaque instant.

Je tiens à remercier globalement tous les membres de l'équipe qui, à un moment ou un autre, m'ont apporté du soutien, des conseils ou de l'aide. Parmi elles, je remercie grandement Valérie Prouzet-Mauléon. Tu as été là au quotidien, toujours bienveillante à mon égard et je sais la chance que j'ai eu de pouvoir travailler à tes côtés et de profiter de tes connaissances et de tes conseils. Ce travail de thèse a mobilisé de nombreuses autres personnes Bruno Cardinaud, Valérie Lagarde, Béatrice Turcq, Jean Max Pasquet, Vanessa Desplat.

Je remercie tous ceux que avec qui j'ai partagé des moments durant ces trois années de thèse, Isabelle, Florence, Matthieu, Hamine, Jean, Hayssam, Sophie, Mélodie.

Je remercie mes colocataires de bureau non cités précédemment qui sont Anne Sophie, Pierre Yves, Olivier. Merci à vous trois pour votre gentillesse et votre disponibilité et les moments de décompression qu'on s'est octroyés.

Je tiens à remercier toute mes amis et mes collègues qui m'ont fait l'honneur d'être là pour me soutenir et célébrer la fin de ma thèse.

Je tiens à remercier ma mamie qui m'a toujours accompagné depuis le début de mes études.

Je tiens aussi à remercier mes parents qui m'ont toujours soutenu et ont toujours cru en moi. Merci pour les valeurs que vous m'avez données.

Enfin je tiens à remercier Cécile qui m'a entouré et a été présente à mes côtés tout au long de cette thèse.

Liste des Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMKL : Leucémie Aiguë Mégacaryoblastique

ARN : Acide ribonucléique

BaP : Progéniteur Basophile

BMCP : Progéniteur Commun au Basophile et Mastocyte au niveau splénique

CEBPA : CCAAT/enhancer-binding protein alpha

CFC : Colony Forming Cell

CFU : Colony Forming Unit

Classification FAB : Classification Franco-Americano-Britannique

CLP : Progéniteur Commun Lymphoïde

CMLP : Progéniteur Lympho-Myéloïde Commun

CMP : Progéniteur Commun érythro-myéloïde

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

CSF : Colony stimulating factor

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

DBD : DNA Binding Domaine

DNMT3A : DNA methyl-transferase 3A

DRN : Domaine de Régulation Négative

ENPP3 : Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 3

FISH : Fluorescence In Situ Hybridization

FLT3 : Fms Like Tyrosine Kinase

GATA1 : GATA Binding Protein 1

G-CSF : Granulocyte Colony Stimulating Factor

GM-CSF : Granulocyte-Macrophage colony stimulating factor)

GMP : Progéniteur Granulocyte Monocyte

GMP : Progéniteur Granulocyte Monocyte

HAT : Histones Acétyltransférases

HDAC : Histone Désacétylase

HLA : Human Leucocyte Antigen

IDH1 et IDH2 : Isocitrate dehydrogenase 1 et 2

IgE : Immunoglobuline E

IL : Interleukine

IL1RL1 : Interleukin 1 receptor-like 1

KIT : Récepteur au SCF

LAB : Leucémie aiguë à Basophiles

LAL : Leucémie Aiguë Lymphoblastique

LAM : Leucémie Aiguë Myéloblastique

LMC : Leucémie Myéloïde Chronique

MLL : Mixed Lineage Leukemia

MPO : Myéloperoxydase

NASDA : Naphtol AS Cétate Esterase

NGF : Nerve Growth Factor

NOD-SCID : Non Obese Diabetic-Severe Combined Immuno Deficiency

NPM1 : Nucleophosmin 1

NTRK1 : Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 1

NUP 98 : Nucléoporine 98

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

Pré-BMP : Progéniteur Commun au Basophile et Mastocyte au niveau médullaire

RT-qPCR : Quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction

RUNX1 : Runt-related transcription factor 1

SCF : Stem cell Factor

ST-CSH : short term CSH

TAD : Transactivation Domain

TAM : Myélopoïèse Transitoire Anormale

TET2 : Tet Methylcytosine Dioxygenase 2

TK : thrombocytémie essentielle

TPO : Thrombopoïétine

TSLP : Thymic Stromal Lymphopietin

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-----------|
| Liste des Abréviations | 4 |
| TABLE DES MATIERES | 7 |
| Avant-Propos..... | 11 |
| INTRODUCTION..... | 13 |
| I) La Leucémie Aiguë..... | 14 |
| La classification des LAM | 14 |
| <i>La cytologie</i> | 18 |
| <i>Immunophénotypage</i> | 19 |
| <i>Cytogénétique</i> | 19 |
| <i>Les translocations</i> | 19 |
| <i>Anomalies avec perte ou gain de matériel</i> | 21 |
| <i>Anomalies de séquences</i> | 22 |
| Les LAM pédiatriques..... | 24 |
| La leucémie aiguë à basophile | 26 |
| <i>Sur le plan clinique</i> | 29 |
| <i>Sur le plan biologique</i> | 30 |
| II) L'hématopoïèse..... | 32 |
| Généralités..... | 32 |
| Les cellules souches hématopoïétiques | 34 |
| Les progéniteurs hématopoïétiques..... | 36 |
| Les précurseurs unipotents | 36 |
| Modèle myéloïde de l'hématopoïèse..... | 37 |
| La différenciation myéloïde | 38 |
| Régulation environnementale..... | 42 |
| III) La « basophilopoïèse »..... | 46 |
| Généralités et fonctions | 46 |
| Déroulement de la basophilopoïèse. (CSH-GMP-pré BMP ou BMCP-BaP-Baso)..... | 47 |
| <i>Localisation</i> | 47 |
| <i>Régulation cytokinique</i> | 51 |
| IV) Mécanismes de régulation moléculaire..... | 56 |
| Régulation moléculaire de l'hématopoïèse | 57 |
| <i>PU.1</i> | 58 |
| <i>CEBPA</i> | 58 |

| | |
|--|-----|
| <i>MYB</i> | 59 |
| <i>GATA1</i> | 63 |
| <i>GATA2</i> | 66 |
| <i>MITF</i> | 67 |
| Régulation de la basophilopoïèse | 67 |
| Bases moléculaire de la leucémogènèse..... | 71 |
| <i>CEBPA</i> | 73 |
| <i>MYB</i> | 74 |
| <i>GATA1</i> | 76 |
| <i>FLT3</i> | 77 |
| <i>KIT</i> | 78 |
| <i>RAS</i> | 78 |
| <i>NPM1</i> | 78 |
| <i>RUNX1</i> | 79 |
| <i>DNMT3A</i> | 79 |
| <i>Histones acétyltransférases (HAT) et désacétylases (HDAC)</i> | 80 |
| <i>TET2</i> | 80 |
| <i>IDH1 et IDH2</i> | 81 |
| OBJECTIFS | 82 |
| DISCUSSION..... | 128 |
| PERSPECTIVES..... | 142 |
| REFERENCES..... | 145 |

Table des Illustrations

| | |
|--|----|
| Figure 1: Quelques exemples de frottis correspondant aux sous type LAM0, LAM1, LAM2, LAM3, LAM4 et LAM6 après coloration au MGG..... | 18 |
| Figure 2: aspect de « basophiloblaste » après coloration au May Grunwald-Giemsa. | 27 |
| Figure 3: Caractéristiques ultra structurales de « basophiloblastes »..... | 28 |
| Figure 4: La protéine de fusion MYB-GATA1 | 31 |
| Figure 5: Schéma récapitulatif des principaux sites de l'hématopoïèse au cours du développement | 33 |

| | |
|---|-----|
| Figure 6 : Multiples modèle de représentation de l'hématopoïèse..... | 38 |
| Figure 7: Hématopoïèse et facteurs de transcriptions. | 39 |
| Figure 8: Schéma de l'hématopoïèse et régulation cytokinique..... | 42 |
| Figure 9: Les cellules souches hématopoïétiques (HSCs) et les progéniteurs hématopoïétiques occupent des lieux différents (niches) dans la moelle osseuse..... | 45 |
| Figure 10: Polynucléaire basophile après coloration en May-Grunwald-Giemsa | 46 |
| Figure 11: Modèle des voies de développement des basophiles et mastocytes. | 50 |
| Figure 12: Caractéristiques moléculaires de la voie de signalisation IL-33/ ST2..... | 54 |
| Figure 13: La protéine MYB | 60 |
| Figure 14: MYB et la régulation de ses gènes cibles impliqués dans l'hématopoïèse..... | 61 |
| Figure 15: La protéine GATA1 | 65 |
| Figure 16: Modèle de régulation du développement des basophiles et des mastocytes par les facteurs de transcription. | 70 |
| Figure 17: Modèle intégré sur l'origine des mutations « driver » et « passager » durant la leucémogénèse | 72 |
| Figure 18: Représentation graphique de l'évolution clonale de la première tumeur à la rechute et screening de l'évolution dans 8 cas appariés de cancer primaire avec rechute..... | 73 |
| Figure 19: Modèle illustrant 3 possibles relations pouvant exister entre des protéine de fusion et MYB pouvant aboutir une leucémie après régulation de différents programmes transcriptionnels. | 76 |
| Figure 20: MYB-GATA1 augmente l'activité du promoteur de l'IL1RL1 dans des cellules 293T. | 133 |
| Figure 21: MYB-GATA1 augmente l'activité du promoteur de l'IL1RL1 dans des cellules K562..... | 134 |
| Figure 22: MYB-GATA1 augmente l'activité du promoteur de l'IL1RL1 dans des cellules K562 exprimant un faible niveau de MYB endogène..... | 135 |

Avant-Propos

L'hématopoïèse est un processus physiologique complexe et finement régulé qui à partir d'une cellule souche hématopoïétique permet le développement de différents types cellulaires. Ces cellules appartiennent au système hématopoïétique qui inclut également des structures privilégiées pour la croissance des cellules de l'hématopoïèse (micro environnement spécifique, niche hématopoïétique) et l'auto-renouvellement des cellules souches de l'hématopoïèse. La production des cellules du sang repose sur la régulation des processus de prolifération et de différenciation secondaires à la sécrétion de molécules extracellulaires (facteurs de croissance notamment), à l'existence de molécules intra-cytoplasmiques et membranaires (récepteurs et voies de transduction du signal), et intranucléaires (facteurs de transcription et gènes spécifiques). Schématiquement, on distingue deux grandes lignées : la lignée lymphoïde et la lignée myéloïde.

La dérégulation d'un ou de ces deux paramètres fondamentaux (prolifération et différenciation) conduit à la transformation d'une cellule normale en cellule leucémique, c'est la leucémogénèse. On distingue ainsi les hémopathies chroniques, caractérisées par l'augmentation de la prolifération d'un ou plusieurs types cellulaires, des hémopathies aiguës, durant lesquelles les cellules bloquées à un stade précoce de la différenciation prolifèrent de manière excessive.

Le travail que nous allons aborder porte sur une leucémie aiguë myéloblastique basophile qui s'articule autour d'une translocation entre les chromosomes X et 6 et conduit à un gène de fusion *MYB-GATA1* mettant en contact deux facteurs de transcription clés de l'hématopoïèse : MYB et GATA1. Dans un premier temps, nous verrons quelques généralités sur les LAM, en particulier les pédiatriques dont cette leucémie aiguë basophile (LAB) très particulière. Afin

d'aborder les mécanismes fonctionnels et moléculaires, nous reprendrons ensuite quelques bases de l'hématopoïèse normale, avec une focalisation sur la myélopoïèse et la basophilopoïèse. Puis, la compréhension des mécanismes moléculaires fera appel à quelques connaissances sur les facteurs de transcription qui seront principalement présentés pour leur implication dans l'hématopoïèse, la basophilopoïèse puis la leucémogénèse. Ces éléments d'introduction nous permettront de présenter l'objectif de ce travail qui est de reproduire au mieux le phénotype particulier de cette leucémie. En effet, cette translocation spécifique induit un engagement vers la lignée basophile et ces travaux visent à appréhender les mécanismes de dérégulations à l'origine de ce phénotype en utilisant de nouvelles approches *in vitro* et *in vivo*.

INTRODUCTION

I) La Leucémie Aiguë

La leucémie, du grec *leukos*, (blanc) et *haima* (sang), se définit comme une malignité caractérisée par une accumulation incontrôlée de cellules immatures non différenciées de la moelle osseuse, les blastes, qui ne répondent pas normalement aux signaux de différenciation et de prolifération. Ces pathologies très hétérogènes sont caractérisées par l'émergence d'une ou plusieurs populations de cellules immatures et/ou par leur représentation anormale. On distingue 2 grands types de leucémies aiguës, les leucémies aiguës lymphoblastiques et les leucémies aiguës myéloblastiques. Les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) sont caractérisées par une prolifération clonale de blastes de la lignée myéloïde associée à un blocage de la différenciation. A l'inverse, dans les leucémies myéloïdes chroniques (LMC), en dehors des phases d'acutisation, il n'existe pas à proprement parler de prolifération blastique mais une production excessive et persistante de globules blancs au sein de la moelle osseuse.

La classification des LAM

Les LAM sont habituellement classées selon le système de classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ou le système de classification franco-américano-britannique (FAB). Le système de classification de l'OMS est plus récent que le système FAB. Ce système se base sur les caractéristiques cytologiques, cytogénétiques et moléculaires de la LAM pour les regrouper en plusieurs catégories générales. La classification OMS a récemment été révisée (Arber *et al*, 2016). Ces progrès sont essentiellement liés au développement du séquençage de nouvelle génération qui a permis d'identifier des mutations génétiques cruciales pour le développement d'une LAM et d'améliorer certains critères diagnostiques d'entités déjà présentes dans la classification 2008 ou bien d'inclure de nouveaux sous-groupes.

Cette classification comprend essentiellement 4 catégories : LAM avec anomalies génétiques récurrentes ; LAM avec signes de dysplasie touchant plusieurs lignées ; LAM secondaires à des thérapeutiques ; LAM autres, n'entrant pas dans les catégories précédentes. Nous présentons ici les dernières mises à jour (Arber *et al*, 2016) :

LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes

- LAM avec t(8;21) (q22;q22) ; RUNX1-RUNX1T1
- LA promyélocytaire avec PML-RARA
- LAM avec inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1q22) ; CBFβ-MYH11
- LAM avec t(9;11)(p22;q23) ; MLLT3-KMT2A
- LAM avec t(6;9)(p23;q34) ; DEK-NUP214
- LAM avec inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2) ; GATA2, MECOM
- LAM (mégacaryoblastique) avec t(1;22)(p13;q13) ; RBM15-MKL1
- LAM avec mutation NPM1
- LAM avec mutation bi allélique CEBPA
- Entités provisoires : LAM avec BCR-ABL1
 LAM avec mutation RUNX1

LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies

- Soit faisant suite à un syndrome myélodysplasique ou un syndrome myéloprolifératif/dysplasique
- Soit avec anomalie(s) cytogénétique(s) de syndrome myélodysplasique : voir tableau plus bas

Néoplasies myéloïdes post chimiothérapie

LAM sans autre spécification par ailleurs (NOS)

- LA Myéloblastique avec différenciation minimale
- LA Myéloblastique sans maturation
- LA Myéloblastique avec maturation
- LA myélomonocytaire
- LA monoblastique / monocytaire
- LA érythroïde pure [l'érythroleucémie (= ancienne LAM6) a disparu en 2016]
- LA mégacaryoblastique
- LA Myéloblastique à composante basophile
- LA avec myélofibrose (panmyélose aiguë)

Parallèlement à cette classification OMS, il existe une classification FAB basée sur les aspects morphologiques des blastes et divisée en 7 sous-groupes. Le tableau ci-dessous met en évidence les correspondances existant entre la classification OMS 2008 et la classification FAB

| OMS 2008 | FAB |
|---|--|
| <i>Groupe avec anomalies cytogénétiques récurrentes</i> | |
| LAM avec t(8;21) (q22;q22) ; RUNX1-RUNX1T1 | LAM avec maturation (LAM2 – FAB) |
| LAM avec t(15;17) (q22;q12) ; PML-RARA | LA à promyélocytes (LAM3 – FAB) |
| LAM avec inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1q22) ; CBFB-MYH11 | LA Myélomonocytaire aiguë avec éosinophiles anormaux (LAM4eo – FAB) |
| LAM avec t(9;11)(p22;q23) ; MLLT3-MLL | LA Monoblastique (LAM5 – FAB) |
| LAM avec t(6;9)(p23;q34) ; DEK-NUP214 | LAM avec maturation et excès de basophiles (LAM2 – FAB) |
| LAM avec inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2) ; RPN1-EVI1 | LAM avec mégacaryocytes anormaux (voir LA à mégacaryocytes) |
| LAM (mégacaryoblastique) avec t(1;22)(p13;q13) ; RBM15-MKL1 | LA mégacaryoblastique (LAM7 – FAB) |
| Entités provisoires : LAM avec mutation NPM1 LAM avec mutation CEBPA | Divers types de LAM (souvent LA sans maturation, myélomonocytaires ou monoblastiques) |
| <i>Groupe avec anomalies associées aux myélodysplasies</i> | |
| - Faisant suite à un syndrome myélodysplasique ou un syndrome myéloprolifératif/dysplasique - Ou présentant des anomalies cytogénétiques identiques à celles des myélodysplasies | |
| - Ou présentant une dysplasie sur > 50% des cellules d'au moins 2 lignées myéloïdes | Divers types morphologiques : souvent LAM sans ou avec maturation, ou LA myélomonocytaires |
| <i>Groupe des LAM post chimiothérapie</i> | |
| Une seule entité quel que soit le traitement | |
| <i>Groupe sans spécification particulière</i> | |
| LAM avec différenciation minime | |
| LAM sans maturation | LAM 0 – FAB |
| LAM avec maturation | LAM 1 – FAB |
| LA myélomonocytaire | LAM 2 – FAB |
| LA monoblastique / monocytaire | LAM 4 – FAB |
| LA érythroïde : LA érythroïde pure | LAM 5 – FAB |
| LA mégacaryoblastique | LAM 6 – FAB |
| LAM à composante basophile | LAM 7 – FAB |
| LA (panmyélose aiguë) avec myélofibrose | |

Nous allons maintenant approfondir les différents éléments ayant permis de mettre en place cette classification que ce soit au niveau cytologique, immunophénotypique, moléculaire ou cytogénétique.

La cytologie

L'analyse cytologique du frottis médullaire est l'examen fondamental qui permet de poser le diagnostic de LAM au-delà d'un seuil d'infiltration blastique. La classification FAB (Bennett *et al*, 1976) a défini morphologiquement pour la première fois la leucémie aiguë myéloïde (pourcentage de blastes, présence de corps d'Auer, positivité de la réaction estérase).

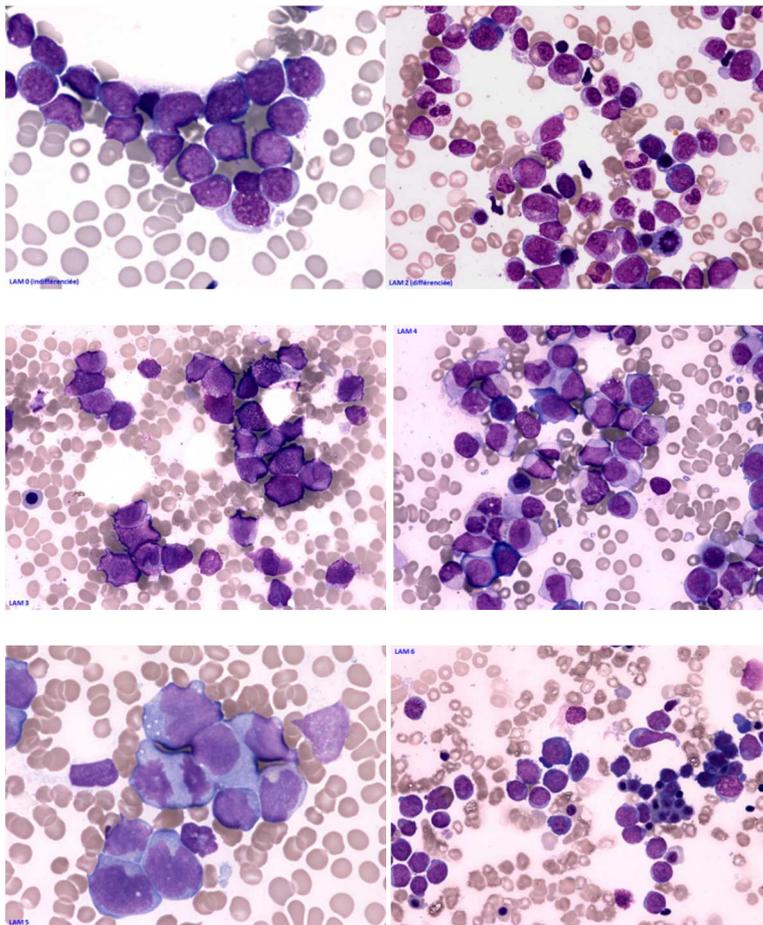


Figure 1: Quelques exemples de frottis correspondant aux sous type LAM0, LAM1, LAM2, LAM3, LAM4 et LAM6 après coloration au MGG (issu du laboratoire de cytologie, CHU Bordeaux)

Immunophénotypage

L'immunophénotypage est effectué de façon systématique en cytométrie de flux. Il a souvent valeur de confirmation d'un diagnostic morphologique déjà fait mais peut avoir une valeur diagnostique en cas de formes morphologiquement indifférenciées. Ainsi il existe des marqueurs pan-myéloïdes CD13, CD33, CD65, CD117 (Bene *et al*, 1995). Son aide est extrêmement importante au diagnostic ou en cas de rechute notamment pour différencier les LAM0 (CD34+, HLA-DR+, CD13+, CD33+) et les LAM7 (CD34+, HLA-DR+, CD13+/-, CD41+, CD61+, CD42b+, CD36+, CD45+).

Cytogénétique

L'analyse cytogénétique des LAM est essentielle et permet de différencier plusieurs cas où des anomalies clonales sont identifiées. Ces anomalies existent dans 75-80% des cas de LAM de l'enfant et on distingue entre autres des translocations, des pertes de matériel chromosomique ou des trisomies.

Les translocations

Il s'agit de l'anomalie cytogénétique la plus fréquente qui aboutit à des recombinaisons et des juxtapositions de gènes normalement séparés. Elles peuvent être intra-chromosomiques (anomalies au sein d'un même chromosome) ou inter-chromosomiques (fragments faisant l'objet du remaniement situés sur 2 chromosomes distincts). Les anomalies sont dites équilibrées lorsque qu'aucun gain ni perte de matériel chromosomique n'est observé. Elles peuvent être responsables de la production d'une protéine chimérique dont le rôle va être variable mais souvent déterminant dans le développement d'une leucémie. Cependant tout remaniement chromosomique de ce type n'a pas forcément de conséquence leucémogène en fonction du contexte environnemental dans lequel il se produit. Comme nous allons le voir un

seul réarrangement de ce type peut conduire au développement d'une leucémie ou bien il faut une juxtaposition de plusieurs événements comme on peut l'observer parfois dans l'acutisation de syndromes myélodysplasiques (Shih *et al*, 2004). Ainsi en parallèle de ces translocations, le réarrangement associé peut conduire à une inactivation d'une copie du gène, et donc une haplo-insuffisance, qui peut agir en coopération avec le transcrit de fusion dans les processus de leucémogénèse. Cet effet a été démontré dans la leucémie aiguë promyélocytaire au cours de laquelle la translocation $t(15;17)(q22;q21)$ aboutit à la formation d'une protéine chimérique, PML-RAR α . L'haplo-insuffisance de *PML* combiné à l'expression de *PML-RAR α* augmente la fréquence et diminue le temps d'apparition de la maladie *in vivo* (Rego *et al*, 2001).

Certaines translocations conduisent à une modification d'activité transcriptionnelle car le gène impliqué dans la translocation est mis au contact d'un promoteur fort ce qui peut provoquer sa surexpression par exemple. On parle alors d'anomalie de type quantitatif. Ainsi dans le cadre de leucémies survenant chez le très jeune enfant il a été mis en évidence une surexpression de *MYB* chez des patients présentant une translocation $t(6;7)$ juxtaposant *TCR β* et *MYB* (Clappier *et al*, 2007).

D'autres translocations peuvent être responsables de la création d'un gène chimérique ou gène de fusion lorsque 2 gènes se juxtaposent dans le même sens et conservent un cadre de lecture ouvert. Dans ce cas il s'agit d'une anomalie qualitative. Le gène de fusion peut soit être activé en continu soit avoir une activité transcriptionnelle si un ou les deux gènes impliqués est un facteur de transcription.

Il existe ainsi plusieurs exemples :

L'un des cas les plus connus d'activité constitutive est celui de la translocation $t(9;22)$ à l'origine de la protéine de fusion BCR-ABL1 aboutissant à l'activation constitutive du domaine kinase présent sur ABL1 (Shtivelman *et al*, 1985). Cette activation continue, va entraîner une dérégulation du cycle cellulaire et une baisse de l'apoptose.

Dans le cas de la translocation t(8;21) qui conduit au gène de fusion *RUNX1-RUNX1T1* (anciennement *AML1-ETO*), on est en revanche en présence d'un gène de fusion ayant une activité transcriptionnelle modifiée. En effet, le domaine de liaison à l'ADN de *RUNX1* est lié à *RUNX1T1* qui est un répresseur transcriptionnel. Comme le domaine de liaison à l'ADN de *RUNX1* a conservé la capacité de se lier à ces cibles transcriptionnelles, le gène de fusion va avoir une activité de répresseur transcriptionnel. (Frank *et al*, 1995)

Dans le cas de translocation t(10;11) impliquant *NUP98* (Nucléoporine 98) et *HHEX* (*hematopoietically expressed homeobox gene*, aussi connu sous le nom de proline-rich homeobox *PRH*), qui a habituellement une activité de répresseur transcriptionnel va devenir activateur transcriptionnel, avec comme conséquence dans un modèle murin, un blocage de la différenciation et une augmentation de l'auto-renouvellement (Jankovic *et al*, 2008) ainsi qu'une dérégulation de gènes impliqués (*FLT3*, *HOXA5*, *HOXA9*, *PBX3*) dans plusieurs modèles de leucémies (Palmqvist *et al*, 2007).

Anomalies avec perte ou gain de matériel

Les anomalies chromosomiques déséquilibrées (avec perte ou amplification de matériel génétique), tout comme les monosomies, les délétions, les trisomies ou duplications, sont associées aux leucémies aiguës myéloblastiques. Parmi les plus fréquentes on retrouve :

Les délétions du chromosome 5 qui sont parmi les plus communes et les plus fréquentes décrites que ce soit dans les leucémies aiguës myéloblastiques ou les syndromes myélodysplasiques acutisés ou non. Les anomalies touchent le plus souvent le bras long du chromosome 5 (del5q). Il existe en position 5q31 et 5q32 des gènes suppresseurs de tumeur. Ainsi des études sur un modèle murin, ont suggéré un rôle central du gène *mDial1*, dans le réseau suppresseur de tumeur, qui implique plusieurs gènes situés en 5q. Ce réseau participerait à l'homéostasie du système hématopoïétique, équilibrant la croissance et la différenciation des

précurseurs et des cellules souches hématopoïétiques (Eisenmann *et al*, 2009). Il est ainsi facilement compréhensible qu'un déséquilibre de ce réseau favorise l'apparition d'une LAM.

Une autre anomalie fréquemment rencontrée est la monosomie 7 qui est un facteur de sévérité associé à un mauvais pronostic dans les leucémies aiguës myéloblastiques (Hasle *et al*, 2007).

Certaines leucémies aiguës myéloblastiques présentent des aberrations chromosomiques multiples. On parle de caryotype complexe lorsqu'il y a plus de 3 anomalies chromosomiques de structure ou de nombre. Ces leucémies à caryotype complexe touchent préférentiellement les personnes âgées et sont associées à une valeur pronostique défavorable (Chen *et al*, 2007; Mrózek, 2008). Une autre entité correspond aux caryotypes complexes monosomiques correspondant à la présence d'au moins 2 monosomies pour des autosomes différents (chromosomes non sexuels) ou bien d'une ou plusieurs monosomies d'un autosome associée à au moins une anomalie structurale (Breems *et al*, 2008).

Anomalies de séquences

En dehors des translocations ou des anomalies de nombre, les leucémies peuvent être associées à des mutations ponctuelles. Ainsi plusieurs mutations sont étudiées systématiquement dans le cadre des leucémies aiguës myéloïdes.

Des analyses cytogénétiques et moléculaires ont conduit à une classification fonctionnelle des altérations génétiques (Shih *et al*, 2012). On distingue :

Les anomalies de classe I : anomalie de gènes contrôlant certaines voies de signalisations (FLT3, RAS, KIT...) conférant un avantage prolifératif aux cellules. Les gènes concernés sont donc essentiellement des tyrosines kinases.

Les anomalies de classe II correspondent à des anomalies de gènes contrôlant la différenciation et la transcription (CEBPA, RUNX1, NPM1...) qui sont des cibles privilégiées des translocations dans les LAM.

Les anomalies Classe III correspondent à des anomalies de gènes impliqués dans la régulation épigénétique (TET2, DNMT3A, ASXL1, IDH1 ou IDH2). Les mécanismes de régulation épigénétique permettent de contrôler l'expression des gènes par l'intermédiaire de modifications de l'ADN sans changement de la séquence nucléotidique associée. Ces modifications concernent essentiellement la méthylation des cytosines et les modifications post traductionnelles des histones.

Ces anomalies seront développées ultérieurement dans le sous-chapitre centré sur les anomalies de régulation moléculaire.

Les LAM pédiatriques

Les LAM représentent environ 20% des leucémies aiguës de l'enfant affectant chaque année en France 75 à 80 patients de moins de 15 ans (Clavel *et al*, 2004) et sont le plus souvent primitives. Leur incidence est stable de la naissance à 10 ans puis connaît une légère augmentation au moment de l'adolescence. La répartition des leucémies aiguës et leur pronostic varient selon l'âge et le sous-type myéloïde et lymphoïde. Chez les enfants (de 1 à 15 ans), 80 % des leucémies aiguës sont des formes lymphoblastiques, alors que ces maladies sont proportionnellement rares chez l'adulte. Le sex ratio est approximativement de 1. La survie à 5 ans des leucémies aiguës de l'enfant (1 à 15 ans) était estimée à 82 % pour les LAL et à 55 % pour les LAM à la fin des années 1990, alors que la survie pour les enfants de moins de 1 an était respectivement de 48 et 45% (Goubin *et al*, 2006). Durant les 2 dernières décennies, la survie globale après 5 ans des enfants atteints de LAM est passée à plus de 65%. De nouveaux composants thérapeutiques, l'intensification des doses, l'augmentation de la durée de la chimiothérapie d'induction, la disponibilité de donneurs compatibles apparentés dans l'allogreffe de moelle osseuse et la classification des leucémies par groupes de risque sont des facteurs ayant contribué à ce progrès.

La proportion de patients porteurs d'anomalies chromosomiques (70-85 %) est plus importante que chez les adultes (40-47 %). En ce qui concerne les translocations, le réarrangement MLL (Mixed-Lineage Leukemia), localisé dans la bande chromosomique 11q23 et fréquemment réarrangé dans plusieurs types de leucémies, ainsi que la t(8;21) sont plus fréquents contrairement à l'adulte chez lesquels il existe plus de t(15;17) et d'inversion du 16 (inv(16)).

Il existe aujourd'hui des éléments indiquant que la majorité des leucémies pédiatriques ont une origine prénatale par l'acquisition d'altérations chromosomiques et génétiques *in utero* durant l'hématopoïèse fœtale. Ainsi la présence de la même séquence de fusion au niveau des blastes leucémiques de jumeaux ne s'expliquerait que par une origine monoclonale prénatale de leurs

leucémies (Greaves *et al*, 2003). L'origine prénatale a également été évaluée chez des patients présentant une LAM avec translocation t(8;21) pour lesquels des PCR sur les cellules sanguines récoltées lors des tests de Guthrie à la naissance avaient mis en évidence la présence de la translocation (Wiemels *et al*, 2002). Ce premier événement prénatal ne serait cependant pas suffisant pour l'apparition de la leucémie ; un deuxième événement génétique rare, postnatal, serait nécessaire et c'est ce qui expliquerait que des jumeaux issus d'une grossesse monochoriale mono-amniotique aient une évolution différente : l'un pouvant présenter une leucémie liée à un 2nd événement et l'autre pouvant être indemne. (Kempinski *et al*, 2003).

La leucémie aiguë à basophile

La leucémie aiguë à basophile (LAB) est une entité hématologique rare, décrite pour la première fois au début du XX^{ème} siècle par Joachin et Uber. Il s'agissait de 2 patients présentant une importante basophilie associée à une leucémie aiguë myéloïde. Le premier cas identifié de leucémie aiguë basophile fut décrit par Wick et coll. (Wick *et al*, 1982). La leucémie à basophiles est estimée à 2 % de l'ensemble des hémopathies malignes et à 4 à 5 % des leucémies non lymphoblastiques (Gupta *et al*, 2004), essentiellement décrite chez l'adulte âgé avec une médiane d'âge chez les adultes avoisinant les 53 ans. Cependant, il faut distinguer les LAB *de novo* des leucémies myéloïdes accompagnées d'un contingent de basophiles constitué pour la plupart de basophiles matures. C'est le cas notamment des leucémies aiguës myéloïdes avec translocation t(6;9) qui ont été souvent associées à une basophilie modérée, sans symptôme hyperhistaminémique mais avec un pronostic défavorable que cette translocation soit associée ou non à une duplication FLT3-ITD (Sandahl *et al*, 2014). Des leucémies myéloïdes chroniques (LMC) en phase chronique ou d'acutisation peuvent également correspondre à ce sous-groupe. La particularité de cette hémopathie consiste en la survenue possible d'une hyperhistaminémie liée à la dégranulation basophile, responsable d'éruptions cutanées à type de rash urticarien, d'œdème, de prurit, de symptomatologie digestive (nausées, diarrhée) ou vasculaire (réaction anaphylactique).

L'observation du frottis sanguin peut orienter le diagnostic par la présence mixte de blastes à grains basophiles denses et de blastes indifférenciés (Duchayne *et al*, 1999). L'examen des frottis médullaires permet de retrouver ces deux types de blastes associés à des précurseurs et cellules matures basophiles. Les blastes caractéristiques sont de taille moyenne à grande avec un haut rapport nucléo-cytoplasmique, de forme régulière, arrondie, avec une chromatine fine, parfois nucléolée (Figure 2). Le cytoplasme est faiblement basophile et renferme, en quantité variable, des gros grains foncés, violet noir, pouvant recouvrir la surface nucléaire. Ces cellules

basophiles peuvent être confondues avec des cellules mastocytaires quand leur cytoplasme est entièrement recouvert de grains foncés. À côté de ces blastes évocateurs pouvant représenter 0 à 70% des blastes (Duchayne *et al*, 1999), il existe un contingent de blastes indifférenciés, qui peut égarer le diagnostic (Shvidel *et al*, 2003).

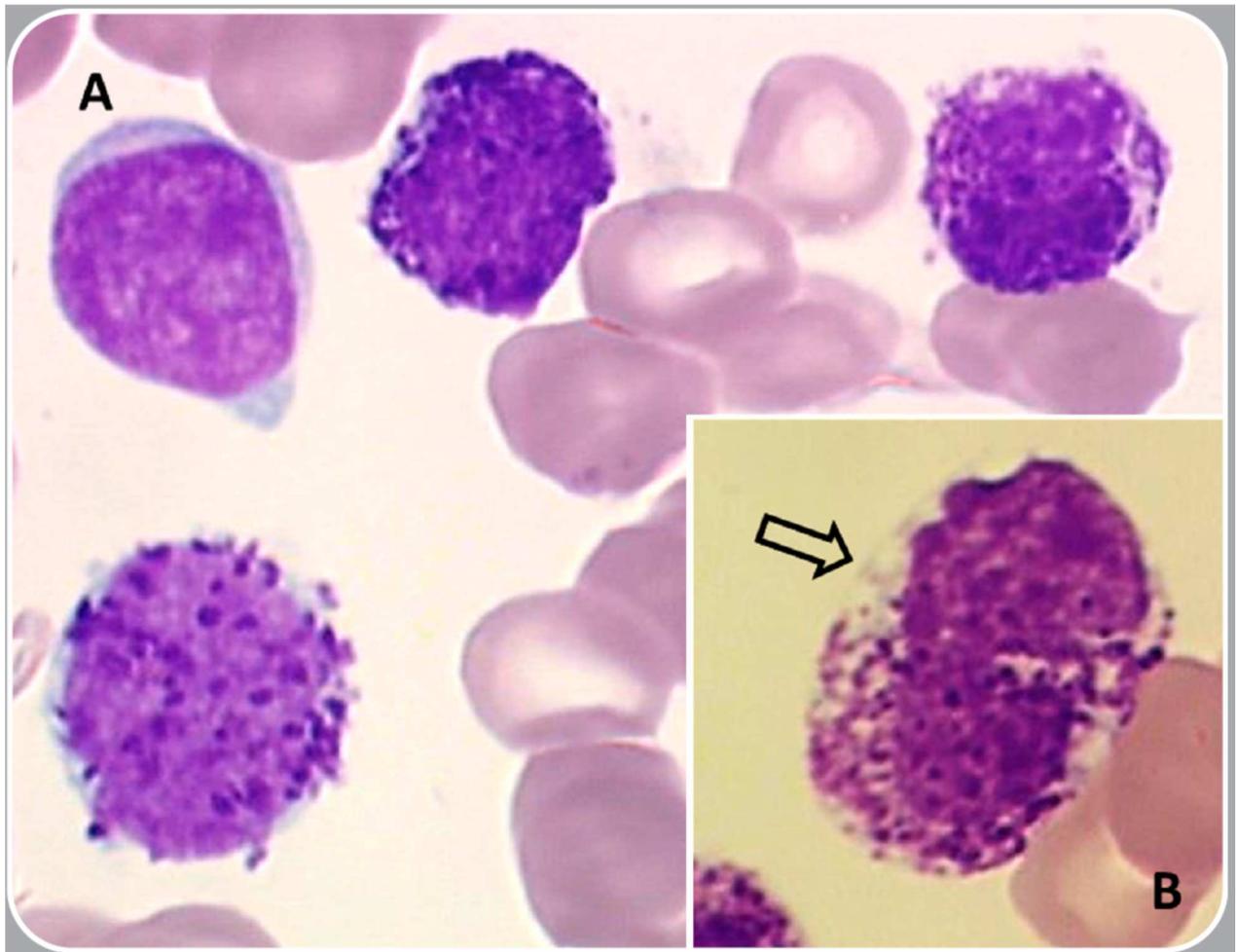


Figure 2: aspect de « basophiloblaste » après coloration au May Grunwald-Giemsa. Issu de Blood, (Eveillard & Desjonqueres, 2014)

L'exploration par microscopie électronique a été rapportée comme l'examen de choix pour affirmer la nature basophile des grains ou les mettre en évidence quand ils ne sont pas révélés par la coloration au May-Grunwald-Giemsa (Shvidel *et al*, 2003; Duchayne *et al*, 1999). En effet, les caractéristiques morphologiques indifférenciées des blastes peuvent parfois orienter le diagnostic vers une leucémie myéloïde sans caractéristique basophile. L'étude ultra

structurale des blastes en microscopie électronique permet d'authentifier la nature basophile des granules dans le cytoplasme et définit leurs caractéristiques morphologiques et topographiques permettant ainsi de différencier les cellules de la lignée basophile de la lignée mastocytaire. Les « basophiloblastes » sont composés, entre autres, de granules thêta, communs aux basophiles et mastocytes, mais ne contiennent pas de granules en rouleaux (*Figure 3*).

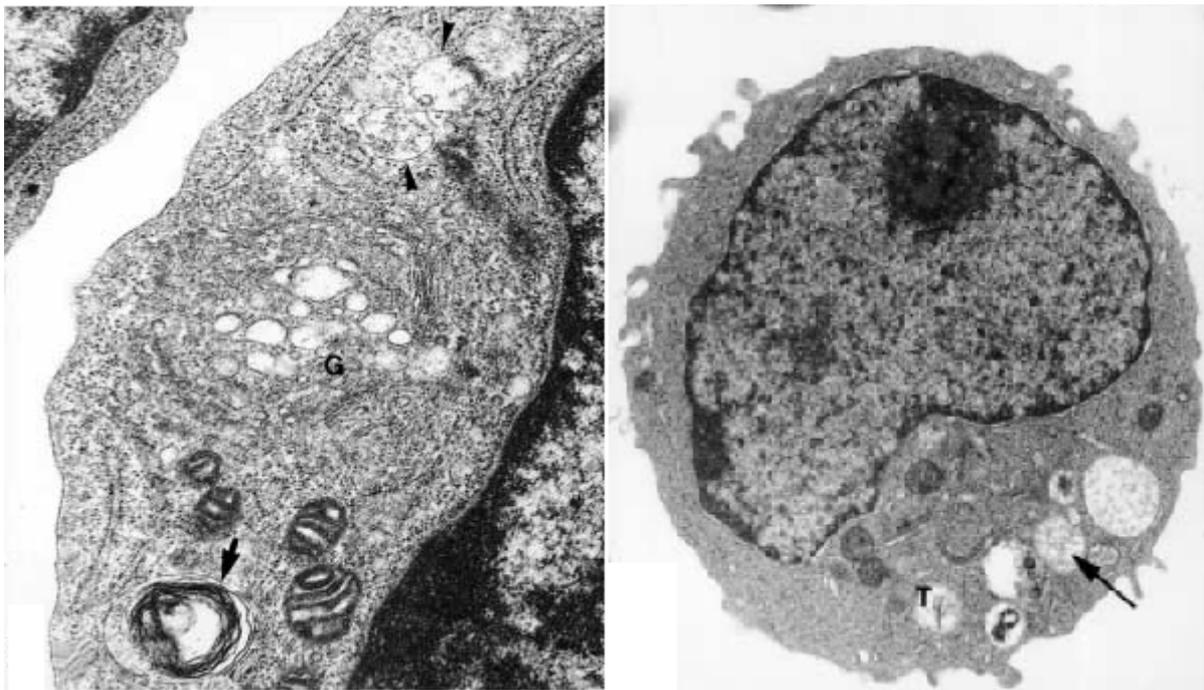


Figure 3: Caractéristiques ultra structurales de « basophiloblastes ».

Les granulations sont présentes à différents stades de maturations : très précoces (flèche courte), mature (tête de flèche) partiellement extériorisés (flèche) granule thêta (T). Issu de British Journal of haematology, Volume 120, Shvidel et coll., 2003.

L'immunophénotypage est également un outil diagnostique : il affirme la nature myéloïde des blastes par la positivité des marqueurs CD13 et CD33. La Myéloperoxydase (MPO) est souvent trouvée négative, de même que la naphthol AS acétate estérase (NASDA), spécifique de la lignée monocyttaire ce qui peut conduire à des diagnostics erronés de leucémie aiguë myéloïde indifférenciée si la cytologie n'a pas mis en évidence les grains basophiles dans les blastes. Les marqueurs d'immaturation (CD34 et HLA-DR) sont fréquemment trouvés positifs. Les blastes

basophiles sont négatifs ou faiblement positifs pour le CD117 (stem cell factor-receptor), ce qui permet de les différencier des mastocytes. De plus, l'expression de CD203c (ENPP3) qui est une protéine transmembranaire de type II appartenant à la famille des ectonucléotide pyrophosphatases/phosphodiesterases est un marqueur spécifique de la lignée basophile présent depuis le stade progéniteur jusqu'à la cellule mature. Il s'agit donc d'un marqueur important afin de pouvoir confirmer le diagnostic dans de tels cas. La positivité du CD203c associée à la négativité du CD117, représente un phénotype très évocateur permettant d'affirmer l'origine basophile des blastes granuleux et indifférenciés. Il permet également d'éliminer l'hypothèse d'une leucémie aiguë myéloïde, *de novo* ou secondaire à un syndrome myéloprolifératif, associée à une basophilie ou l'hypothèse d'une leucémie à mastocytes.

L'analyse cytogénétique des leucémies aiguës à basophiles donne des résultats hétérogènes : translocations récurrentes t(9;22) associées ou non à une trisomie 19, t(8;21), réarrangements 16q22, trisomie 8 associée à une trisomie 21 et translocations t(X;6) chez 5 enfants (Gupta *et al*, 2004; Shvidel *et al*, 2003; Dastugue *et al*, 1997; Quelen *et al*, 2011; Belloni *et al*, 2011; Rojas-Atencio *et al*, 2011; Servitzoglou *et al*, 2014). Mon travail a donc consisté à explorer les mécanismes oncogéniques associés aux anomalies génétiques d'une LAB spécifique avec réarrangement MYB-GATA1.

Sur le plan clinique

Il s'agit d'une entité rare, exclusivement pédiatrique, dont 4 patients ont été décrits dans la littérature et formellement identifiés comme LAB avec t(X;6) (Dastugue *et al*, 1997; Quelen *et al*, 2011). Un 5^{ème} cas évoquant fortement ce diagnostic a été décrit en 2011 (Belloni *et al*, 2011) (Tableau 1). Il s'agissait dans tous les cas de patients masculins ayant un âge médian de 3 mois (1 à 6), avec hyperleucocytose médiane de 125 G/L (53 - 260), une thrombopénie médiane de 42 G/L (9 - 168) et une anémie à 6,6 g/dL (5,4 - 8,3). Cliniquement ces patients

présentaient tous une hépatosplénomégalie et surtout des symptômes d'hyperhistaminémie qu'ils soient cutanés ou digestifs.

Tableau 1 : Caractéristiques clinico-biologiques des patients

| | Age (mois) | Sexe | Symptômes hyperhistaminémie | Organo mégalie | Hb (g/dL) | plaquettes (G/L) | Leucocytes (G/L) | Blastes (%) |
|------------------|---------------|--------|---|-------------------|--------------|---------------------|---------------------|----------------|
| Patient 1 | 2,5 | Garçon | Rash cutané | HSMG | 6,6 | 19 | 140 | 80 |
| Patient 2 | 6 | Garçon | vomissements, méléna | HSMG | 7 | 9 | 260 | 89 |
| Patient 3 | 3 | Garçon | Rash cutané, Diarrhées, vomissements, | HSMG | 6 | 42 | 53 | 77 |
| Patient 4 | 1 | Garçon | Rash cutané, Vomissements | HSMG | 8,3 | 84 | 125 | 87 |
| | | | | | | | | |
| Belloni, 2011 | 6 | Garçon | Vomissements | HSMG | 5,4 | 168 | 35,3 | 38 |

Sur le plan biologique

L'analyse caryotypique mettait en évidence une translocation entre les chromosomes X et 6 conduisant à la fusion entre l'extrémité 5' de MYB et l'extrémité 3' de GATA1, la fusion GATA1-MYB n'étant pas détectée. Compte tenu que le gène GATA1 est sur le chromosome X et que tous les patients étaient des garçons, la protéine GATA1 n'était plus exprimée dans les cellules blastiques des patients. Le gène de fusion comprend le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de transactivation de MYB, le domaine de régulation négative de ce dernier est perdu et remplacé par l'extrémité C terminale de GATA1 comprenant un doigt de zinc (*Figure*

4). Par ailleurs, ces deux gènes ayant une orientation inversée, une translocation ainsi qu'une inversion d'un des deux fragments était nécessaire, la FISH révélant un réarrangement chromosomique déséquilibré.



Figure 4: La protéine de fusion MYB-GATA1 (Issu de Blood, Volume 117, Quelen et coll., 2011)

L'analyse microscopique a mis en évidence des grands blastes, avec un cytoplasme abondant et basophile que ce soit dans le sang ou dans la moelle. La coloration MPO était négative, la coloration NASDA était faiblement positive contrairement à la coloration phosphatase acide qui était fortement positive. La microscopie électronique confirmait le caractère basophile des blastes.

II) L'hématopoïèse

Généralités

Afin de mieux aborder les mécanismes oncogéniques en jeu dans la LAB avec réarrangement MYB-GATA1, nous allons dans un premier temps reprendre quelques éléments fondamentaux concernant l'hématopoïèse. Elle se définit par l'ensemble des mécanismes qui assurent le remplacement continu et régulé des éléments figurés du sang (globules rouges, polynucléaires, plaquettes, monocytes et lymphocytes) qui doivent être produits régulièrement. Ces cellules du sang jouent un rôle dans l'hémostase, le transport de gaz, l'immunité innée et l'immunité adaptative. Elle débute à J21 de la vie embryonnaire, et dérive du mésoderme du sac vitellin où se forment des îlots sanguins. Au sein des îlots sanguins les cellules centrales se différencient en cellules érythroblastiques (nucléées) et les cellules de la périphérie forment les premières cellules endothéliales (= vaisseaux primitifs). A partir de J28, des cellules souches hématopoïétiques apparaissent dans l'aorte dorsale de la région Aorte-Gonades-Mesonephros, qui iront ensuite coloniser le foie puis la rate. La moelle osseuse (MO) commence à être colonisée vers 4 mois et sera le site exclusif de l'hématopoïèse à la naissance et pour toute la vie (tous les os jusqu'à 4 ans, puis uniquement les os courts et plats : sternum, côtes, bassin, crâne, vertèbres). Ces données sont illustrées dans la figure 5.

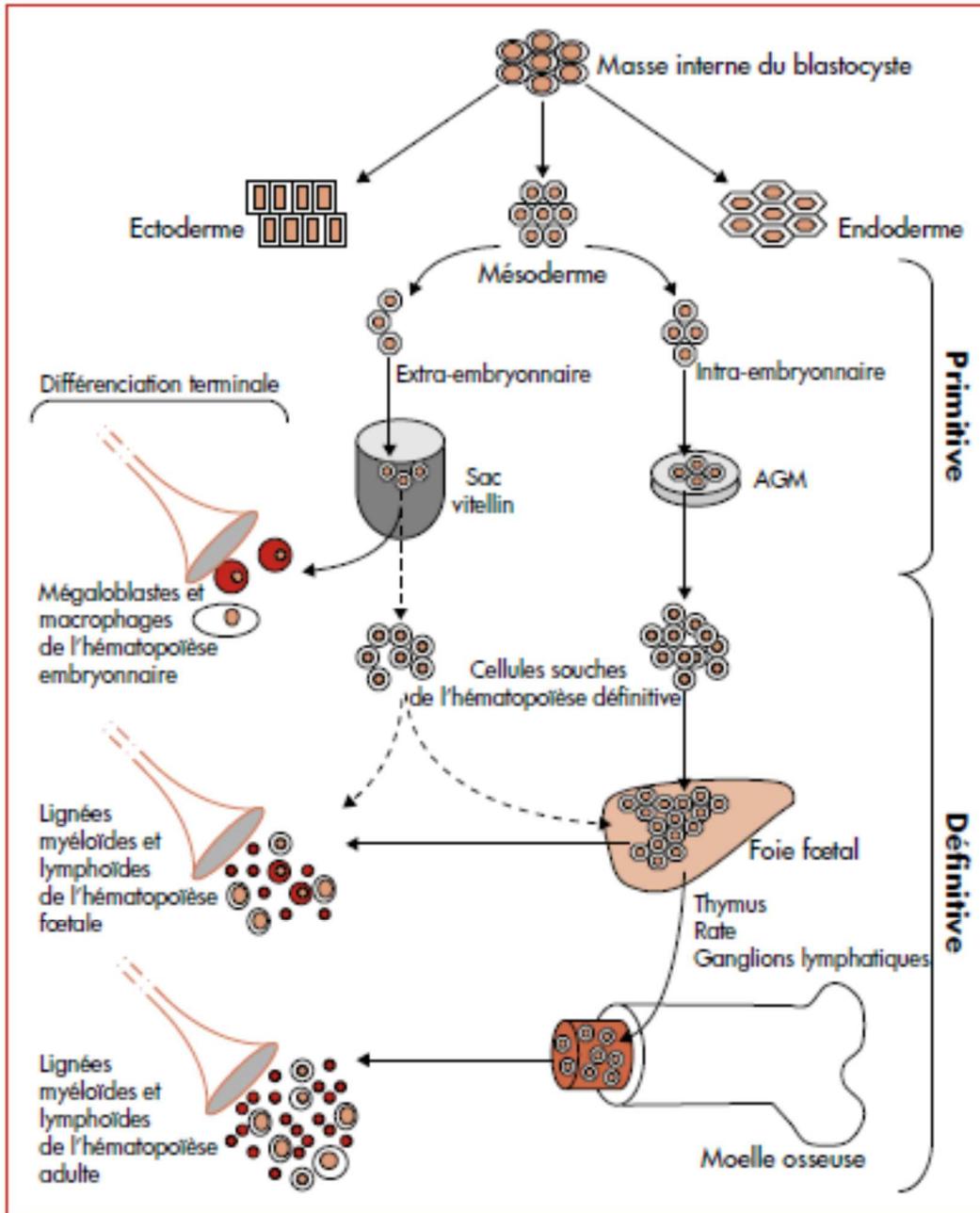


Figure 5: Schéma récapitulatif des principaux sites de l'hématopoïèse au cours du développement.

Les cellules hématopoïétiques primitives proviennent du mésoderme extra-embryonnaire et sont produites dans le sac vitellin. Les cellules hématopoïétiques définitives proviennent du mésoderme intra-embryonnaire. A partir de la 5^{ème} semaine, le foie devient le centre de l'hématopoïèse et produit les cellules sanguines souches définitives. À partir de la 8^{ème} semaine, les cellules souches issues du foie colonisent la circulation le thymus, la rate, la moelle osseuse puis les ganglions lymphatiques qui deviennent organes hématopoïétiques entre la 10^{ème} et la 12^{ème} semaine de gestation. À l'âge adulte, la moelle osseuse est l'organe essentiel de l'hématopoïèse. (Issu de *Hématologie*, Volume 13 (3), E.N. Olivier, 2007).

La moelle osseuse adulte est composée de 60% de cellules granuleuses, 25% de cellules érythroïdes, 10% de lymphocytes, 3% de plasmocytes et 0,5% de mégacaryocytes. Quatre

compartiments cellulaires sont classiquement identifiés : les cellules souches hématopoïétiques (CSH), les progéniteurs hématopoïétiques, les précurseurs unipotents et les cellules matures.

Le point de départ initial est donc la cellule souche hématopoïétique (CSH) qui donne naissance progressivement à des progéniteurs multipotents (short term CSH (ST-CSH)) qui se différencient en progéniteur érythromyéloïde commun (CMP) ou en progéniteur lymphoïde commun (CLP) qui eux-mêmes vont s'engager dans des voies de différenciation permettant d'obtenir *in fine* les cellules sanguines matures en fonction de mécanismes de régulation multiples. La lignée myéloïde regroupe les érythrocytes, les plaquettes, les granulocytes ainsi que les monocytes et a été définie comme telle car les précurseurs de ces cellules ont été initialement observés dans la moelle osseuse. Les lymphocytes T et B forment la lignée lymphoïde nommée ainsi car les lymphocytes ont tout d'abord été identifiés dans la lymphe.

Les cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont des cellules rares et indifférenciées qui possèdent deux propriétés fondamentales : leur capacité à donner naissance à toutes les lignées hématopoïétiques (multipotence) et leur capacité à s'auto renouveler permettant de maintenir un compartiment stable de cellules souches. Ces deux propriétés vont être perdues lorsqu'elles vont s'engager dans une des voies de différenciation hématopoïétique. Les cellules souches peuvent se multiplier par division symétrique ou asymétrique. On distingue deux types de conséquences à la division symétrique : elle peut donner lieu à deux cellules filles identiques à la cellule mère et qui seront destinées à acquérir le même devenir ou donner lieu à deux cellules filles identiques mais plus différenciées que la cellule mère. La division asymétrique correspond en revanche à la capacité des cellules souches à générer simultanément des copies identiques d'elle-même et des cellules filles différenciées. Morphologiquement difficile à

individualiser, la plupart des CSH ne sont pas en cycle et n'y entrent qu'à la suite d'une stimulation par différents facteurs de croissance (cytokines) et autres facteurs de transcription.

La démonstration de leur existence chez l'animal a été d'abord faite par Till et McCulloch (Till & McCulloch, 1961). Ces cellules étaient capables chez la souris, après irradiation à dose sub-léthale et injection de cellules médullaires syngéniques normales, de former des colonies spléniques composées de cellules hématopoïétiques. La cellule à l'origine de ces colonies, désignée par le terme de CFU-S pour « Colony Forming Unit in Spleen » correspondait à une cellule souche pluripotente capable de générer plusieurs lignées cellulaires. Depuis cette première expérience, de nombreuses études ont cherché à identifier et caractériser les cellules souches hématopoïétiques sur des modèles murins mais également chez l'homme. Il est important de noter que toutes les CSH fonctionnelles, ayant des caractéristiques d'immatunité, sont négatives pour de nombreux marqueurs de surface. A l'inverse, l'engagement des cellules dans les différentes lignées est associé à l'apparition de marqueurs de surface et donc normalement exprimés sur les cellules différenciées ou matures. Les CSH murines sont ainsi nommées Lin- (pour lineage négatif).

Chez l'homme, le premier marqueur de CSH, rapporté en 1984 (Civin *et al*, 1984), fut le CD34 qui correspond à un ensemble hétérogène de cellules n'étant pas toutes multipotentes. Ainsi en 1991, Srour et coll. (Srour *et al*, 1991) ont mis en évidence *in vitro* une fraction cellulaire CD34+ et HLA-DR- contenant des progéniteurs capables d'auto renouvellement et de multipotence. Par la suite en 1994, Rusten et coll. (Rusten *et al*, 1994) ont mis en évidence dans des expériences *in vitro* une sous population de CSH plus primitives au sein des CD34+, négatives pour le CD38.

Cependant, ces expériences *in vitro* ne suffisant pas pour conclure quant au rôle de ces sous populations, des expériences *in vivo* de xénogreffes sur souris NOD-SCID (Non-Obese Diabetic/ Severe Combined ImmunoDeficiency) ont permis de démontrer la capacité de

repopulation de la sous population Lin - CD34+ CD38- (Bhatia, 1997). En outre, l'étude des marqueurs CD45RA et CD90 par Majeti et coll., (Majeti *et al*, 2007) a affiné encore plus ces données et permis d'isoler une sous population au sein de progéniteurs multipotents Lin-CD34+CD38-CD90+CD45RA- appelées CSH « long terme ». Dans le cadre des expériences *in vitro* et *in vivo* de notre étude, les CSH/progéniteurs précoces étaient isolés à partir de sang de cordons et sélectionnés sur la positivité du CD34.

Les progéniteurs hématopoïétiques

Les progéniteurs multipotents, qui ne sont pas reconnaissables morphologiquement, sont engagés dans une ou plusieurs voies de différenciation et leur capacité d'autorenouvellement est réduite. Ils se différencient des CSH par l'absence d'expression à leur surface du marqueur CD150 ou SLAMf1 (Signaling lymphocyte activation molecule family member 1) (Kiel *et al*, 2005). Leur capacité de différenciation peut être mise en évidence grâce à des techniques de cultures cellulaires en milieu semi-solide (méthyl cellulose) et en présence de divers facteurs de croissance qui permettent de donner naissance à des colonies de différents types. Ainsi, le progéniteur commun myéloïde a pu être identifié par cette technique de CFC (Colony Forming Cell) assay et correspond à la fraction cellulaire Lin-CD34+CD38+IL-3R α loCD45RA-, capable de générer tous les types de progéniteurs myéloïdes (Manz *et al*, 2002).

Les précurseurs unipotents

Les précurseurs hématopoïétiques sont les premières cellules morphologiquement identifiables de chaque lignée. Ce ne sont plus des cellules souches car elles ont perdu toute capacité d'autorenouvellement (la cellule fille n'est plus identique à la cellule mère). Le compartiment des précurseurs a pour but la multiplication et la maturation cellulaire. Les précurseurs les plus

immatures sont les myéloblastes (futurs polynucléaires), les proérythroblastes (futures hématies), les mégacaryoblastes (futures plaquettes), les lymphoblastes (futurs lymphocytes) et les monoblastes (futurs monocytes). Le déroulement de l'hématopoïèse est dépendant de multiples facteurs de transcription qui seront détaillés ultérieurement.

Modèle myéloïde de l'hématopoïèse

Au fur et à mesure de l'avancée des connaissances sur les différents facteurs intervenant dans le déroulement de l'hématopoïèse, plusieurs équipes ont proposé des révisions du modèle de division à partir des CSH (*Figure 6*). Ainsi en 1977, le modèle « classique » reposait sur la dichotomie entre la lignée myéloïde et lymphoïde (Abramson *et al*, 1977). En 2001, le modèle « myéloïde de l'hématopoïèse » fut proposé. Dans ce dernier, les CSH se divisaient en progéniteur lympho-myéloïde commun (CMLP) et progéniteur érythro-myéloïde commun (CMEP) (Katsura & Kawamoto, 2001). Ce modèle introduit pour la première fois la notion de CMLP qui a depuis été soutenu par de nombreuses études. Cette conception n'est pas incompatible avec la notion de CLP (common Lymphoid Progenitor) comme on peut le constater dans le modèle de Jacobsen (Adolfsson *et al*, 2005). Depuis, de nombreuses controverses ont vu le jour et ce qui semble le plus important dans cette notion de modèle « myéloïde » de l'hématopoïèse est l'aspect fonctionnel et le potentiel développemental des progéniteurs.

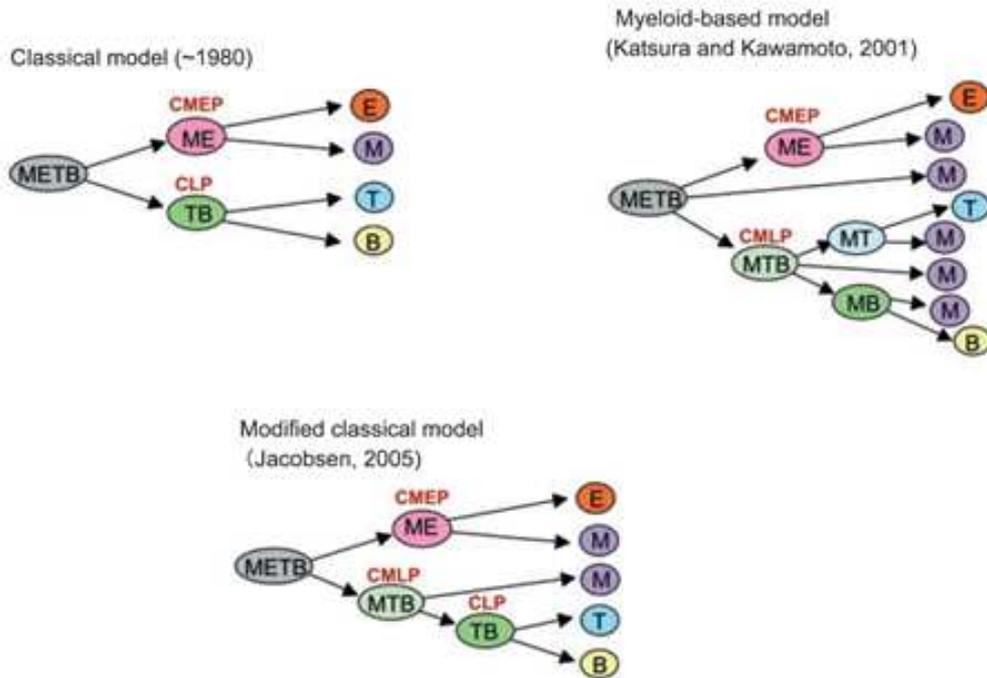


Figure 6 : Multiples modèle de représentation de l'hématopoïèse.

METB : Cellules Souches Hématopoïétiques ; *ME=CMEP* : progéniteur érythro-myéloïde commun ; *MTB=CMLP* : progéniteur lympho-myéloïde commun ; *TB=CLP* : Progéniteur lymphoïde commun ; *E, M, T, B* : progéniteur potentiel pour les cellules éthyroïdes, myéloïdes, lymphoïdes T et B respectivement. (Issu de (Kawamoto et al, 2010), *Immunological Review*, volume 238, 2010)

La différenciation myéloïde

La myélopoïèse est l'ensemble des phénomènes de prolifération et différenciation qui permettent d'aboutir à l'obtention des cellules hématopoïétiques matures de la lignée myéloïde.

Ces processus nécessitent une régulation fine de l'expression de facteurs de transcription majeurs. Ainsi dans la figure 7, on peut observer que de multiples facteurs de transcription interviennent aux différents stades de ce processus. Certains tels GATA1, GATA2 ou GF11 interviennent à différents stades de maturation, d'autres tels PU.1 interviennent dans différentes lignées.

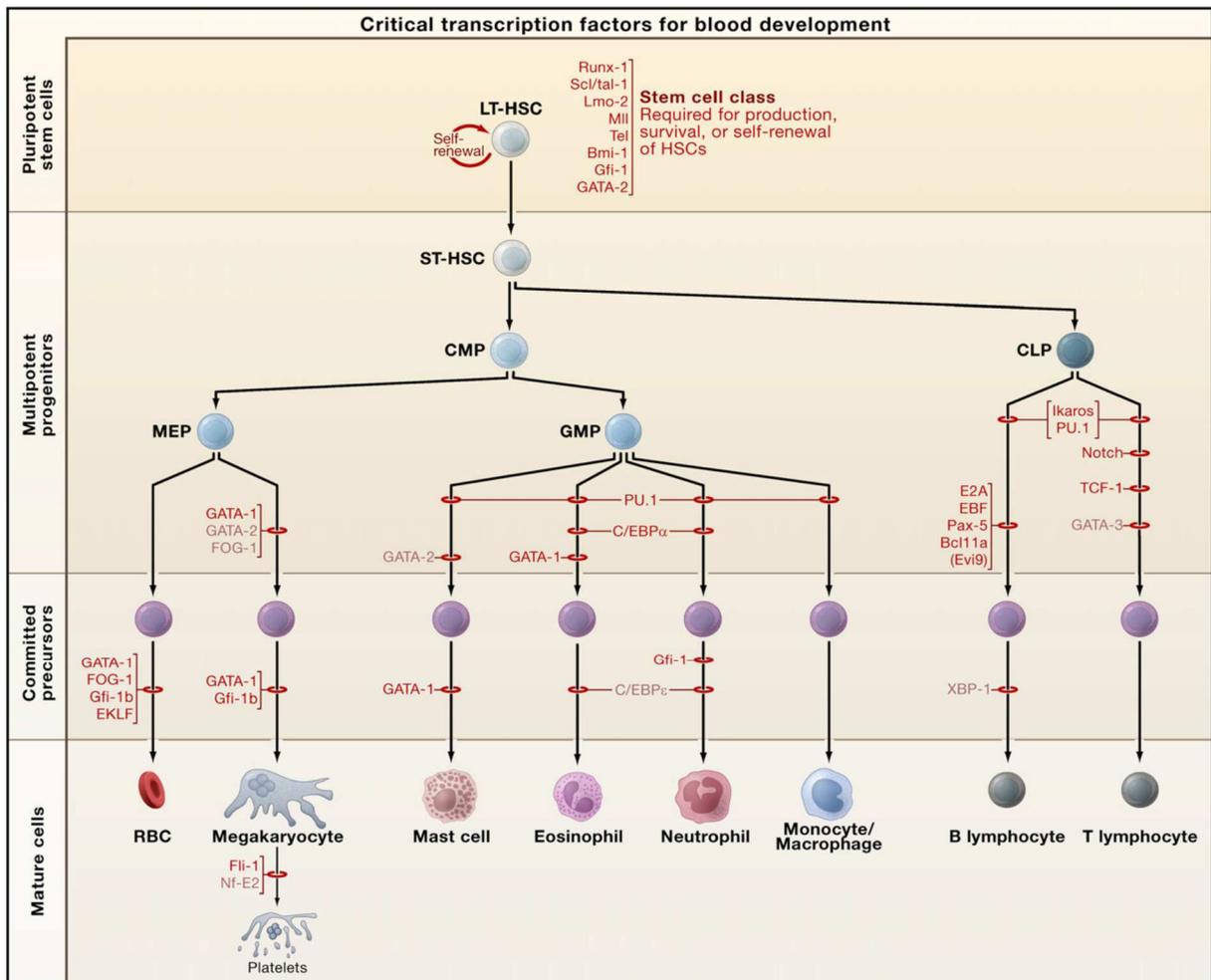


Figure 7: Hématopoïèse et facteurs de transcriptions.

Abbreviations: LT-HSC, long-term hematopoietic stem cell; ST-HSC, short-term hematopoietic stem cell; CMP, common myeloid progenitor; CLP, common lymphoid progenitor; MEP, megakaryocyte/erythroid progenitor; GMP, granulocyte/macrophage progenitor; RBCs, red blood cells. (Issue de Cell, volume 132 (4), Orkin and Zon, 2008).

Ils font également intervenir des cytokines spécifiques de l'engagement dans chaque lignée ou communes à la prolifération des plusieurs types cellulaires. Ces différentes cellules sont facilement analysables *in vitro* à partir de CFU (Colony Forming Unit). L'équivalent du progéniteur commun myéloïde est la CFU-GEMM (CFU-Granulocyte Erythrocyte Monocyte Mégakaryocyte) qui va donner naissance à plusieurs CFU en fonction de cytokines présentes dans le milieu :

- BFU-E, colonie érythroblastique qui donne de volumineuses colonies et la CFU-E qui donne des colonies de plus petites tailles.

- CFU-Meg colonie mégacaryocytaire.
- CFU-GM, colonie de cellules granuleuses neutrophiles et monocytaires
- CFU-Eo qui correspond aux colonies de cellules granuleuses éosinophiles
- CFU-Bas qui est la colonie de cellules granuleuses basophiles

Les facteurs de croissance sont nécessaires pour la survie et la prolifération des cellules hématopoïétiques à tous les stades de développement. Parmi les facteurs qui influent sur les cellules multipotentes, FLT3L (ligand du fms like tyrosine kinase 3), GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor), SCF (Stem Cell Factor), la TPO (Thrombopoïétine), l'interleukine-2, l'interleukine-3, l'interleukine-6 et l'interleukine-7 sont les mieux connus (Kaushansky, 2006). Chacune de ces protéines soutient la survie et la prolifération d'un certain nombre de cellules cibles distinctes, et à l'exception de l'interleukine-7 l'élimination de l'une d'elles n'a pas de répercussion compte tenu de la redondance dans les fonctions de ces facteurs de croissance précoces. Ces facteurs ainsi que de nombreuses autres molécules interagissent à différents stades et sont retrouvés dans le microenvironnement médullaire formant la niche hématopoïétique. Ces interactions peuvent être directes entre les cellules elles-mêmes, via des couples de molécules d'adhérence (intégrines, cadhérines...) mais également indirectes par l'intermédiaire de facteurs solubles et membranaires (cytokines, chimiokines), des facteurs environnementaux (concentration en oxygène, concentration calcique...) et des éléments de la matrice extra-cellulaire (fibronectines, collagènes, protéoglycanes, laminines...). Si le rôle de ces différents acteurs de la régulation des CSH a été largement exploré et commence à être mieux connu, il est actuellement difficile de leur attribuer une fonction unique dans la régulation des CSH. Il est en effet très vraisemblable que de multiples combinaisons soient à l'origine de leurs actions finales sur l'hématopoïèse et l'orchestration de cette harmonie au sein des niches reste à préciser. Parmi les plus importants, on distingue :

Le G-CSF (granulocyte colony stimulating factor), qui permet le recrutement des CSH.

SCF et CXCL12 (CXC chemokine ligand 12) qui sont indispensables à la maintenance des CSH et sont retrouvés à proximité des structures vasculaires (Méndez-Ferrer *et al*, 2010).

E-selectine, P-selectine, VCAM-1 (Vascular Cell adhesion molecule 1) sont exprimées par les cellules endothéliales (Kobayashi *et al*, 2010) et sont connues pour réguler l'homéostasie des CSH.

La TPO dont le rôle principale est connu dans la mégacaryopoïèse possède également un rôle dans l'expansion et l'autorenouveaulement des CSH comme cela a été mis en évidence dans un modèle murin TPO^{-/-} (Fox *et al*, 2002).

La figure 8 illustre l'importance des différentes cytokines intervenant au cours de la différenciation. Cette régulation est à mettre en parallèle de celle faisant intervenir les facteurs de transcription comme illustré dans la figure 7.

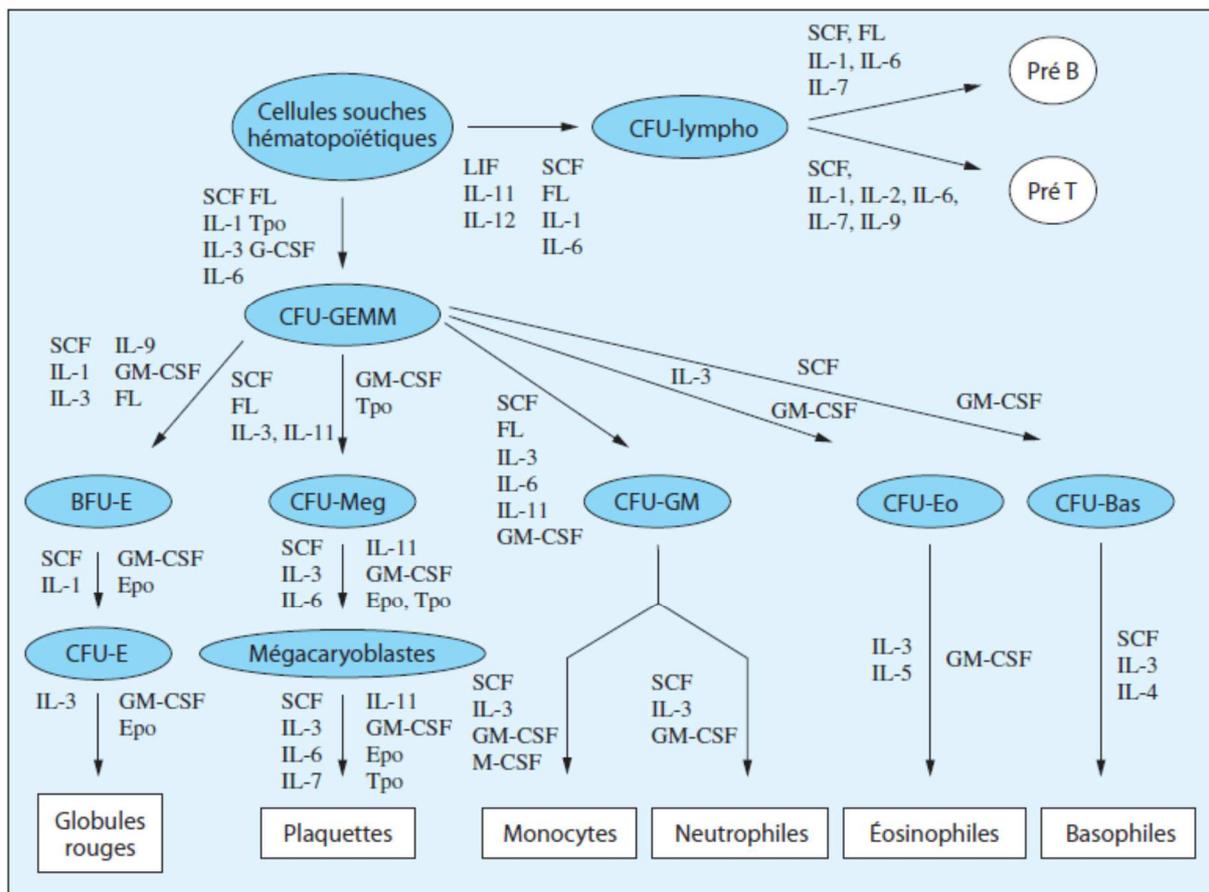


Figure 8: Schéma de l'hématopoïèse et régulation cytokinique.

CFU : colony-forming unit ; BFU : burst-forming unit (E pour érythroblastes, Meg pour mégacaryocytes, GM pour neutrophiles et macrophages, Eo pour éosinophiles, Bas pour basophiles) ; CSF : colony stimulating factor ; IL : interleukines ; SCF : stem cell factor ; Epo : érythropoïétine ; Tpo : thrombopoïétine ; CFU-GEMM : progéniteurs à plusieurs potentialités (granulocytaire, érythrocytaire, mégacaryocytaire et macrophagique). Issu d'Annales de Biologie clinique, Volume 61 (3), Douay 2003)

Cette régulation cytokinique *in vitro* de la différenciation des précurseurs myéloïdes se retrouve *in vivo* au niveau de la moelle osseuse où de nombreux facteurs de régulation interviennent qu'ils soient micro-environnementaux ou intracellulaires. Nous allons maintenant aborder la description des cellules intervenant dans le microenvironnement médullaire et la niche hématopoïétique.

Régulation environnementale

Dans la moelle osseuse, les cellules hématopoïétiques sont associées aux cellules du microenvironnement encore appelé stroma hématopoïétique. Ce stroma est défini comme

l'ensemble des éléments non-hématopoïétiques de la moelle osseuse. Il regroupe de nombreux types cellulaires : cellules endothéliales, cellules stromales à différenciation vasculaire musculaire lisse et adipocytes. Ces cellules interagissent avec les cellules hématopoïétiques soit directement grâce à des molécules d'adhérence intercellulaires, soit indirectement en produisant des facteurs de croissance ou des molécules de la matrice extracellulaire. Des éléments environnementaux tels que la concentration en oxygène et en calcium sont également importants.

La niche hématopoïétique est définie par une anatomie et une fonction. C'est Schofield qui a le premier proposé le concept de niche hématopoïétique, capable de réguler la survie, la quiescence, l'auto-renouvellement et la différenciation des CSH (Schofield, 1978) la décrivant comme « un endroit spécifique qui permet de maintenir les capacités des CSH ». Depuis, le rôle clé du microenvironnement dans la régulation de l'hématopoïèse a été principalement mis en évidence par des expériences de greffes de CSH chez des souris déficientes pour le gène *c-kit* codant pour le récepteur du SCF (Stem Cell Factor) et par des expériences de transgénèse chez la souris (Thorén *et al*, 2008).

Ainsi chaque élément du microenvironnement va intervenir à différents niveaux (*Figure 9*) :

- Les ostéoblastes qui appartiennent à la niche endostéale ainsi que les ostéoclastes (d'origine hématopoïétique) participent au maintien des CSH en quiescence ainsi qu'à l'expression de leur fonctionnalité. Un modèle murin transgénique (Visnjic *et al*, 2001) a permis l'expression d'une thymidine kinase d'herpes virus spécifiquement dans les cellules ostéoblastiques. Cette enzyme devient toxique en présence d'analogues nucléosidiques tel que le ganciclovir qui induit la déplétion de la lignée cellulaire ostéoblastique. Ainsi les auteurs ont mis en évidence que la déplétion des ostéoblastes par Ganciclovir, n'a pas de conséquence immédiate sur les CSH mais provoque une

déplétion des CSH tardive (Visnjic *et al*, 2004), ce phénomène étant réversible à l'arrêt du Ganciclovir.

- Les cellules endothéliales appartenant aux divers vaisseaux qui vascularisent la moelle osseuse représentent plutôt un site de prolifération/auto-renouvellement et de différenciation des CSH. Leur lien avec les CSH existe dès l'embryogenèse. La voie par laquelle ces cellules régulent les balances prolifération/différenciation pourrait être via le recrutement de mTOR et l'activation du signal AKT (Kobayashi *et al*, 2010).
- Les adipocytes augmentent proportionnellement à l'âge et on observe parallèlement une décroissance de la fonction des CSH. Une étude *in vivo* a mis en évidence un possible effet régulateur négatif de ces cellules sur l'hématopoïèse (Naveiras *et al*, 2009).
- Les macrophages ont récemment été impliqués comme ayant un rôle lors de la mobilisation des CSH. En effet, la stimulation par G-CSF est associée à une perte des macrophages et à une réduction de l'ostéogenèse (Winkler *et al*, 2010) et de la sécrétion de facteurs nécessaires à l'auto-renouvellement et la prolifération des CSH au niveau médullaire.
- Enfin, la participation du système neuro-sympathique, des cellules de Schwann ainsi que des lymphocytes T-reg, a apporté une nouvelle dimension neuro-immune à la régulation par les niches médullaires.

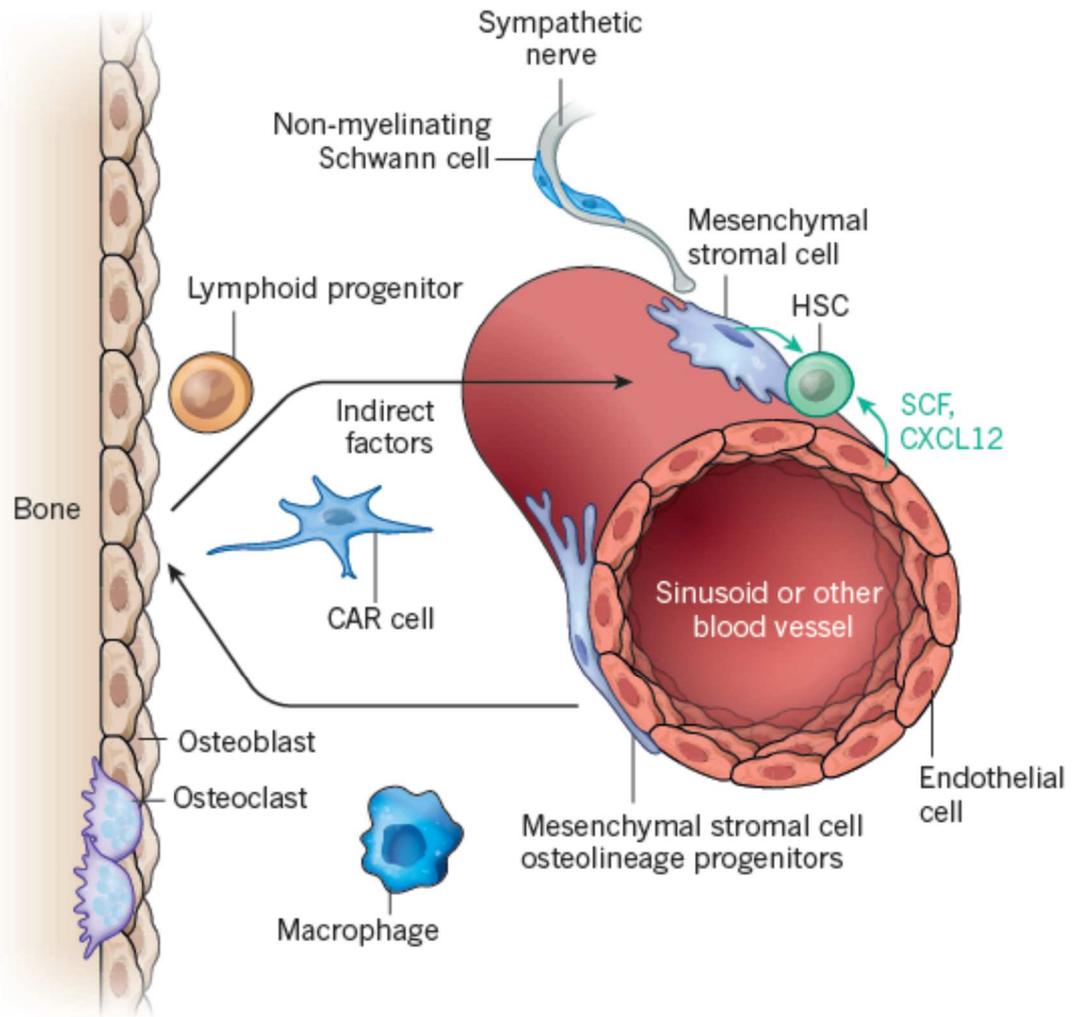


Figure 9: Les cellules souches hématopoïétiques (HSCs) et les progéniteurs hématopoïétiques occupent des lieux différents (niches) dans la moelle osseuse. (Issue de Nature, Volume 505, (Morrison & Scadden, 2014))

III) La « basophilopoièse »

Généralités et fonctions

Les polynucléaires basophiles représentent moins de 1% des leucocytes circulants. Ils ont un noyau bilobé et un cytoplasme riche en granulations. Morphologiquement les polynucléaires basophiles ont un noyau assez volumineux, souvent incisé. Le cytoplasme et le noyau sont recouverts de grosses granulations prenant les colorants basiques d'où le nom de polynucléaires basophiles (*Figure 10*).

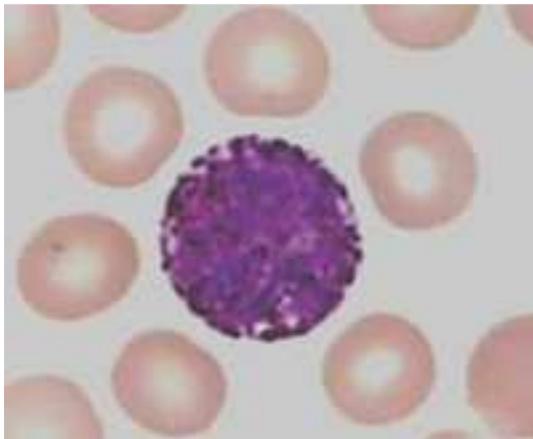


Figure 10: Polynucléaire basophile après coloration en May-Grunwald-Giemsa

Ce terme de basophilie ne doit pas être confondu avec la basophilie cytoplasmique, rencontrée dans les cellules riches en ARN comme les lymphocytes. Les granulations des basophiles sont dites métachromatiques car elles ont la propriété de se colorer en rouge violet lorsqu'elles sont au contact de colorant bleu comme le bleu de toluidine. Un autre colorant métachromatique spécifique des basophiles et des mastocytes peut également être utilisé, il s'agit du Bleu Alcian (Grundström *et al*, 2012).

Les polynucléaires basophiles et les mastocytes sont des acteurs essentiels des réponses allergiques et sont des cellules clés de l'hypersensibilité immédiate (type 1). Ce mécanisme de l'allergie, dépend de la fixation d'IgE sur ces cellules (par l'intermédiaire d'un récepteur

spécifique FcεRI) et d'un second contact avec l'allergène. Il conduit à l'activation des basophiles et des mastocytes, à l'origine de la libération extracellulaire de dérivés actifs comme l'histamine, des protéases, les dérivés des leucotriènes et prostaglandines, et de nombreuses cytokines. Tous ces médiateurs sont à l'origine des signes cliniques immédiats puis retardés de la réaction allergique.

Les polynucléaires basophiles possèdent également, comme les mastocytes, des fonctions importantes dans la régulation des réponses immunitaires. Grâce à leur production d'IL-4 en réponse à une stimulation allergénique, les polynucléaires basophiles participent aussi à la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th2 durant la réponse immunitaire primaire. Ces lymphocytes de type Th2, sont des lymphocytes T helper qui jouent un rôle importants dans la réaction allergique notamment par la sécrétion de différentes cytokines (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) permettant la stimulation des lymphocytes B au cours des réponses immunitaires secondaires. Leur rôle a longtemps été limité à ces fonctions avec une migration vers les tissus dans certaines conditions pathologiques (allergies et parasitoses) où ils interagissent avec les mastocytes tissulaires et les éosinophiles. Cependant depuis plusieurs années, il semble que les polynucléaires basophiles correspondent à une population hétérogène intervenant dans de nombreuses situations physiologiques ou pathologiques.

Déroulement de la basophilopoïèse. (CSH-GMP-pré BMP ou BMCP-BaP-Baso)

Localisation

Les polynucléaires basophiles dérivent des cellules souches hématopoïétiques et mûrissent dans la moelle osseuse avant de circuler dans le sang sous forme mature (Voehringer, 2013). Le premier progéniteur post CSH impliqué dans la basophilopoïèse, est le progéniteur granulocyte

monocyte (GMP). Ces derniers sont dépourvus de marqueurs de lignée monocyttaire ou granulocytaire mais expriment à leur surface le CD34 et c-kit (CD117+). Ainsi ils sont définis comme Lin-CD34+ c-kit+. Plusieurs hypothèses concernant les stades de maturations ultérieurs ont ensuite été émises. L'une d'elle fait référence à un progéniteur commun entre basophile et mégacaryocyte, étayée par la production d'histamine par des lignées mégacaryoblastiques comme UT7 (Dy *et al*, 1999). Cette hypothèse a permis de mettre en évidence un anticorps spécifiques des basophiles le 97A6 (Bühring *et al*, 1999) ayant conduit à l'identification de la molécule CD203c qui appartient à la famille des pyrophosphatase/phosphodiésterase (ENPP3), enzymes agissant sur des ectonucléotides. Une autre hypothèse qui semble maintenant retenue est l'existence d'un progéniteur commun au basophiles et aux mastocytes (pré-BMP). En effet, Qi et coll. (Qi *et al*, 2013), ont identifié une nouvelle population de cellules exprimant à leur surface le FcεRIa, capables de générer basophiles et mastocytes après stimulation par l'interleukine-3 (IL-3). Ces cellules correspondraient à une étape de maturation supplémentaire et ont été dénommées progéniteurs pré-basophiles et mastocytes (pré-BMPs). Ces cellules sont incapables de se différencier en basophiles ou mastocytes en l'absence de GATA2 (Li *et al*, 2015). La dernière étape de maturation avant la production de basophiles circulants est le progéniteur basophile (BaP) qui est principalement retrouvé au niveau médullaire.

Par ailleurs, si les voies de maturation sont complexes il en est de même pour la localisation de cette maturation. L'essentiel de ces démonstrations a été fait sur des modèles murins. En effet, si les GMP sont connus pour résider dans la moelle osseuse, une équipe a mis en évidence chez la souris, dans la rate, des cellules portant des marqueurs membranaires présents sur les pré BMPs et capables de générer des cellules ressemblant aux mastocytes et aux basophiles en présence d'IL-3 (Arinobu *et al*, 2005). A l'inverse, une autre équipe avait mis en évidence que ces précurseurs spléniques se différenciaient préférentiellement en mastocytes après analyse de

marqueurs de surface chez des souris déficientes pour le promoteur 1 du facteur de transcription RUNX1 qui présentent un effondrement du taux de cellules basophiles circulantes (Mukai *et al*, 2012). Plus récemment, Siracusa (Siracusa *et al*, 2013) a identifié au niveau splénique des progéniteurs Lin-CD34⁺ckit⁺ FcεRI Iα⁺ capables de donner naissance notamment à des cellules basophiles. Ces cellules qui seraient régulées en partie par la cytokine TSLP (thymic stromal lymphopoietin) seraient des équivalents spléniques des pré-BMP retrouvés dans la moelle et sont dénommées BMCPs. (*Figure 11*)

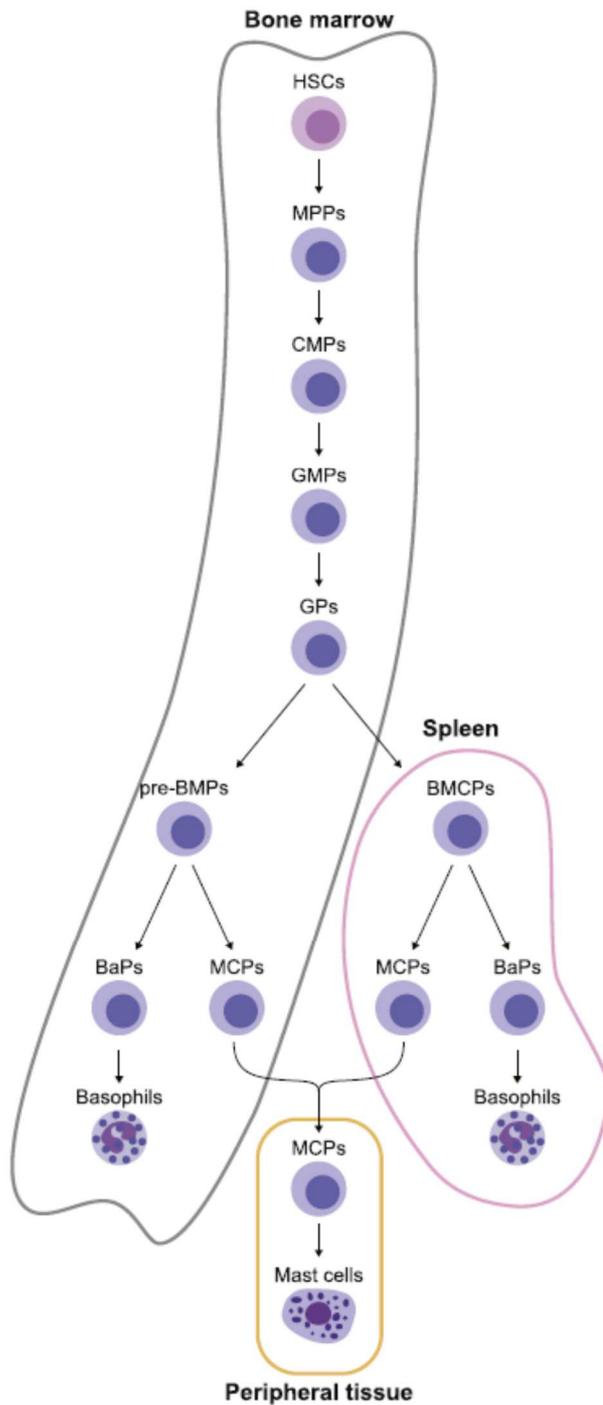


Figure 11: Modèle des voies de développement des basophiles et mastocytes.

Basophiles et mastocytes dérivent des CSH via les MPP, CMP et GMP. IL existe de progéniteurs bipotentiels capable de donner naissance à des basophiles ou des mastocytes, les pré-BMP dans la moelle osseuse et les BMCP au niveau splénique. Ces progéniteurs se différencient en précurseurs unipotents BaP et MCP (Issue de Allergology international, (Sasaki et al, 2016)).

Régulation cytokinique

Si les sites et les étapes de maturations basophiles sont complexes, il en va de même en ce qui concerne la régulation de ces étapes où de nombreux acteurs interviennent tels les cytokines, des mécanismes de régulation épigénétique ou des facteurs de transcription. Ainsi, plusieurs cytokines sont importantes dans le déclenchement ou la poursuite de cette maturation. Parmi les principales, on retrouve :

L'interleukine-3

Le rôle de l'IL-3, principalement produite par les cellules T activées, comme facteur de croissance des basophiles est bien documenté (Ohmori *et al*, 2009) et est notamment observé dans les infections à helminthes (Lantz *et al*, 1998; Shen *et al*, 2008). Par ailleurs l'interleukine 3 augmente la survie des cellules basophiles via l'induction de NFκB (Zheng *et al*, 2002) et l'augmentation de la sérine/thréonine kinase Pim-1 (Didichenko *et al*, 2008). IL-3 joue également un rôle dans l'induction des fonctions effectrices des basophiles. Ainsi l'interaction de l'IL-3 avec son récepteur active la production d'IL-4 via l'activation de la voie de signalisation JAK2/STAT5 (Voehringer, 2013). Enfin, l'IL-3 amplifie la réponse des basophiles après stimulation par des IgE. C'est ce qu'ont démontré Gibbs et coll., qui ont mis en évidence une augmentation de la sécrétion d'IL-4 et IL-13 en présence d'IL-3 après stimulation par anti-IgE (Gibbs *et al*, 1996). Plus récemment, il a été démontré dans plusieurs pathologies (asthme notamment) que le développement des basophiles était lié également au microenvironnement infectieux bactérien dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales (Hill & Artis, 2013) ou viral dans l'asthme (Agrawal *et al*, 2014) et aux variations de concentrations d'IL-3 qui y sont associées.

L'immunoglobuline E (IgE)

L'IgE est également très importante pour la fonction des basophiles via son interaction avec son récepteur à haute affinité le FcεRI (Kraft & Kinet, 2007). En effet, sous l'effet de l'IgE les basophiles sont activés et libèrent de nombreuses molécules comprises dans leurs granules cytoplasmiques telles l'histamine et l'adénosine triphosphate. En outre, la liaison de l'IgE avec son récepteur influence aussi la libération d'interleukines, de leucotriènes et de PAF (platelet activating factor). Ainsi l'IL-3 et l'IgE coopèrent pour moduler l'activité des cellules basophiles, leur fonction et leur survie.

Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP)

Une autre cytokine intervient dans la régulation des fonctions et de l'activation des basophiles, il s'agit de la TSLP. En effet cette cytokine est un régulateur clé de la sécrétion des cytokines Th2 associées aux maladies inflammatoires. Il semble que cette activité soit liée aux basophiles circulants qui sont capables de restaurer la réponse de type Th2 en cas de déficit en TSLP. En outre son récepteur (TSLPR) est présent à la surface des progéniteurs basophiles médullaires et son apport exogène dans des modèles murins déficients en IL-3 permet de restaurer la basophilopoïèse (Siracusa *et al*, 2011). Cette fonctionnalité essentiellement mise en évidence dans des modèles murins semble conservée chez l'homme puisque des cellules progénitrices de l'hématopoïèse CD34+ expriment le TSLPR à leur surface (Allakhverdi *et al*, 2009). Ceci est aussi vrai pour les basophiles circulants puisque plus de 70% expriment TSLPR à leur surface (Siracusa *et al*, 2011). Une étude plus récente a mis en évidence *in vitro* une augmentation de la production de basophiles à partir de cellules CD34+ lorsque de la TSLP est ajoutée à l'IL-3 dans le milieu de culture (Hui *et al*, 2014).

L'interleukine-33(IL-33)

En plus des cytokines classiques, l'IL-33 a été plus récemment mise en évidence comme intervenant au niveau de l'activité des basophiles humains. Il s'agit d'une cytokine associée à la super-famille de l'IL1 décrite comme un potentiel déclencheur de la réponse de type Th2. L'IL-33 participe à la réaction inflammatoire, et s'associe à d'autres cytokines pour promouvoir les réponses de cellules NK, Th2 et des lymphocytes T CD8+. L'IL-33 active également les mastocytes et les basophiles après interaction avec son récepteur spécifique hétérodimérique composé d'une protéine principale IL1R-ST2 (IL1RL1) et d'une protéine accessoire (IL1RAcP) (Pecaric-Petkovic *et al*, 2009). Suite à la liaison avec son récepteur et après son hétérodimérisation, IL-33 active les voies de signalisation MAPK et NFκB et induit ainsi la prolifération et l'activation cellulaire (*Figure 12*). Dans un modèle murin, l'administration systémique d'IL-33 augmente le nombre de basophiles médullaires (Schneider *et al*, 2009). Par ailleurs, l'expression de son récepteur est à la fois augmentée par l'IL-3 (Suzukawa *et al*, 2008) et la TSLP (Siracusa *et al*, 2011). Enfin, chez l'humain, la présence d'IL-33 dans le milieu de culture augmente la sécrétion d'IL-4, IL-5 et IL-6 par les basophiles ainsi que l'expression de CD11b à leur surface (Smithgall *et al*, 2008).

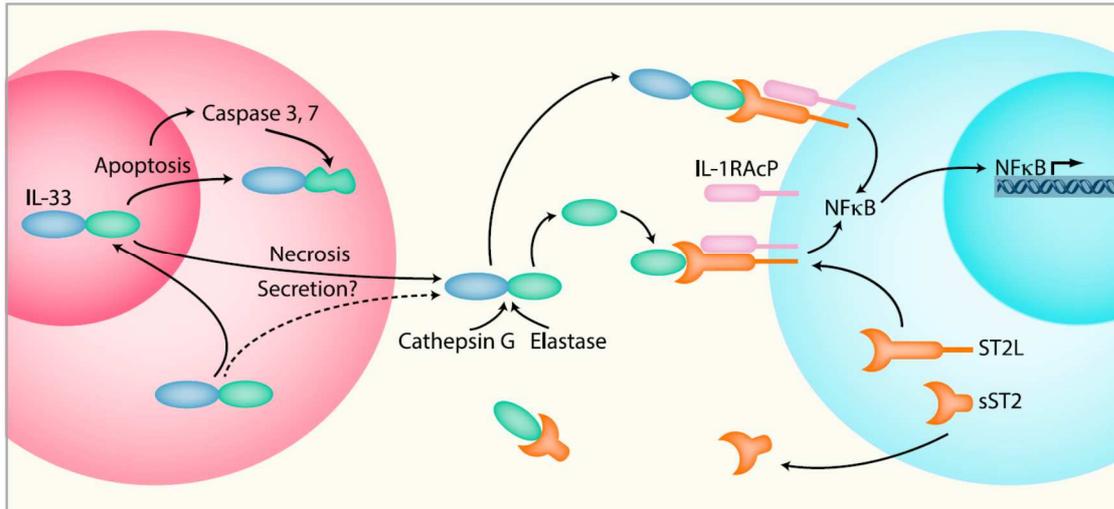


Figure 12: Caractéristiques moléculaires de la voie de signalisation IL-33/ ST2.

L'IL-33 est transcrite à partir de 7 exons codant et transportée dans le noyau. L'activation des voies apoptotiques conduit à l'inactivation de l'IL-33 après clivage via la caspase 3 ou 7. Durant le phénomène de lyse cellulaire associée à la nécrose ou directement par sécrétion à partir de cellules normales, l'IL-33 est libérée du noyau et relarguée en extra cellulaire. Une fois libérée, l'IL-33 peut être transformée par l'intermédiaire de sérine protéases comme l'athépsine-G et l'élastase dans des formes ayant une activité augmentée. Le récepteur ST2 de l'IL-33 est produit sous 2 formes, une forme courte soluble (sST2) et une forme longue ST2L. sST2 est constitutivement exprimé et mais il peut être active durant les phases de dommage tissulaire, il lie l'IL-33 et diminue sa disponibilité. Au contraire l'IL-33 libre, se lie au récepteur ST2L associé à IL-1R1+AcP sur les cellules cibles et induit l'activation des voies NFκB et MAPK conduisant à l'activation et à la prolifération cellulaire. (Issu de *Immunity Review*, (Molofsky et al, 2015))

Nerve Growth Factor (NGF)/NTRK1

NGF appartient à la famille des neurotrophines et est un facteur trophique qui promeut la survie des neurones sensitifs et sympathiques *in vitro* et *in vivo*. Les effets de NGF sont médiés par la liaison à son récepteur de haute affinité TRKA ou NTRK1 à activité tyrosine kinase transmembranaire et dans une moindre mesure par la liaison avec son récepteur de faible affinité p75NTR. Après liaison au NGF, son récepteur se dimérise et induit une auto-phosphorylation des résidus tyrosines au niveau des extrémités cytoplasmiques. NGF semble important dans le développement et la prolifération des progéniteurs myéloïdes (Matsuda *et al*, 1988). Bien que peu décrit, le NGF possède un rôle dans la fonction des basophiles. Ainsi, en 1992, il a été montré que l'exposition au NGF de basophiles humains augmente le relargage d'histamine et de leucotriène C4 en réponse à des stimuli de manière indépendante de l'IgE (Bischoff & Dahinden, 1992). Par ailleurs, il a été montré que seuls les basophiles expriment le NTRK1 à

leur surface (Bürge *et al*, 1996). Plus récemment il a été mis en évidence que NGF augmente, tout comme l'IL-3 mais avec une efficacité plus faible, la libération des médiateurs après stimulation par IgE en activant la phosphorylation de p38MAPK (Gibbs *et al*, 2005).

IV) Mécanismes de régulation moléculaire

La régulation moléculaire de l'hématopoïèse repose sur différentes molécules que sont notamment les facteurs de transcription. Comme nous avons pu le voir précédemment ces éléments interviennent lors des différentes étapes de cette maturation de manières multiples et complémentaires. Les facteurs de transcription régulent la transcription seuls ou sous forme de complexe avec d'autres protéines : ils activent ou inhibent le recrutement de l'ARN polymérase sur des gènes spécifiques. Les mécanismes de régulation sont multiples :

- La stabilisation ou l'inhibition de la fixation de l'ARN polymérase sur l'ADN
- L'acétylation des histones qui amoindrit l'association de l'ADN avec les histones ou bien au contraire la désacétylation des histones ce qui renforce l'association de l'ADN avec les histones.
- Le recrutement de protéines co-activatrices ou co-répressives au complexe de transcription de l'ADN.

Tous ces facteurs sont composés de plusieurs domaines fonctionnels :

- Un ou plusieurs domaines de liaison à l'ADN qui sont de divers types tels que le domaine leucine zipper, hélice-boucle-hélice, hélice-tour-hélice et doigt de zinc;
- Un domaine de transactivation et/ou de répression qui recrute des cofacteurs ou qui interagit directement avec la machinerie transcriptionnelle pour réguler la transcription.

Ils régulent la genèse et la fonction du système hématopoïétique et des différentes voies permettant d'obtenir les cellules matures du système sanguin. Via leur domaine de liaison à l'ADN, ils sont capables de se fixer dans les régions régulatrices (promoteur, enhancer et silencer) de gènes dont ils modulent l'activité. Les régions enhancer sont des éléments agissant en cis ("cis-acting elements") qui peuvent se situer jusqu'à 1 million de paires de bases (en amont ou en aval) des gènes régulés.

L'engagement des cellules souches hématopoïétiques vers les précurseurs lymphoïdes ou érythromyéloïdes puis la différenciation des cellules au sein de chacune de ces lignées est finement régulée, notamment par l'expression coordonnée dans le temps de nombreux facteurs de transcription. Dès lors des anomalies de séquence au niveau de ces facteurs de transcription peuvent être associées à de nombreuses pathologies de ce système et participer au mécanisme de la leucémogénèse.

Nous aborderons d'abord les principaux facteurs de transcription intervenant dans l'hématopoïèse puis nous étudierons leur implication dans la basophilopoïèse avant de voir en quoi leurs dérégulations moléculaires peuvent participer au développement de la leucémogénèse.

Régulation moléculaire de l'hématopoïèse

Comme nous l'avons vu précédemment, le développement de l'hématopoïèse fait intervenir de très nombreuses molécules dont les facteurs de transcription. Les données présentées dans les paragraphes suivants proviennent principalement d'expériences réalisées chez la souris, modèle dans lequel les approches génétiques, nécessaires à la définition des principaux éléments régulateurs sont plus facilement réalisables. Ainsi, il a été démontré *in vivo* dans un modèle murin que leur ordre d'expression est déterminant pour l'engagement et la maturation des cellules (Iwasaki *et al*, 2006). L'engagement vers une lignée implique l'activation concomitante de gènes spécifiques ainsi que l'inhibition de gènes intervenant dans d'autres lignées. Ce phénomène est contrôlé en partie par un nombre restreint de facteurs de transcription qui se régulent entre eux. Nous allons maintenant décrire plus précisément les facteurs majeurs de la myélopoïèse et de la basophilopoïèse : PU.1, C/EBP α , MYB, GATA1, GATA2 et MITF.

PU.1

Codé par le gène *SP11*, il s'agit d'un membre de la famille des facteurs de transcription à domaine Ets dont l'expression est restreinte aux cellules sanguines (Klemsz *et al*, 1990). Il est exprimé dans les progéniteurs hématopoïétiques mais est également nécessaire pour la formation des progéniteurs communs myéloïdes et lymphoïdes. En son absence, les souris meurent au cours de leur développement embryonnaire, après 18,5 jours de gestation, avec une absence complète de lymphocytes T, B, de monocytes et de granulocytes (McKercher *et al*, 1996).

Par ailleurs, l'activité de PU.1 est modulée par les facteurs de transcription de la famille GATA. GATA1 interagit physiquement avec PU.1 et diminue ses capacités activatrices (Nerlov *et al*, 2000). Dans un modèle cellulaire d'érythroleucémie humaine (K562), cette inhibition de PU.1 par GATA1 semble liée à une méthylation d'histone au niveau de sa région URE (Upstream Regulatory element), l'histone H3, au niveau de sa lysine 9, et au niveau de son promoteur (méthylation sur la lysine 27 de l'histone H3). Cette répression implique également DNMT1 en faisant une cible thérapeutique potentielle dans ce sous type de LA (Burda *et al*, 2016). Les quantités de PU.1 et GATA.1 semblent jouer un rôle critique dans l'engagement vers la lignée lymphoïde ou la lignée myéloïde puis dans la différenciation myéloïde. Un faible niveau de PU.1 corrèle avec l'entrée dans la voie lymphoïde, une expression élevée de PU.1 est associée à une entrée dans la voie myéloïde (DeKoter & Singh, 2000).

CEBPA

Sa séquence codante est située sur le chromosome 19 (19q13) et appartient à la famille des CCAAT/enhancer Binding Protein qui sont des facteurs comprenant un domaine de liaison à

l'ADN de type leucine zipper capable de se lier à la fois au promoteur et aux régions régulatrices de différents gènes et dont l'importance a été démontrée au niveau des différents phénomènes de l'hématopoïèse, prolifération, différenciation et apoptose. Dans le maintien des CSH, il a été démontré un rôle de CEBPA. En effet une délétion de CEBPA est associée à une perte de l'auto-renouvellement des CSH (Hasemann *et al*, 2014). En outre, CEBPA est particulièrement important pour la différenciation myéloïde et notamment grâce à une régulation réciproque existant avec PU.1. Ainsi CEBPA augmente l'expression de PU.1 par liaison avec le promoteur de ce dernier (Kummalue & Friedman, 2003) et réprime son expression en déplaçant son cofacteur c-Jun (Reddy *et al*, 2002). Cependant il existe de multiples interactions autres de CEBPA notamment via la régulation du gène codant pour le récepteur au G-CSF (Zhang *et al*, 1997) et son rôle exact dans la différenciation myéloïde reste encore débattu.

MYB

La famille des gènes *MYB* comprend 3 membres, *A*, *B* et *C-MYB* qui codent pour des protéines nucléaires ayant un rôle de facteur de transcription. L'expression de *A-MYB* est limitée à la glande mammaire, le tissu spermatogénique, le système nerveux central et les cellules T et B. A l'inverse, *B-MYB* semble ubiquitaire et sa disparition est associée à un arrêt de développement très précoce chez la souris (Tanaka *et al*, 1999). L'oncogène *C-MYB* est l'analogue cellulaire du gène *v-MYB* des virus AMV (Avian Myeloblastosis Virus) et E26 capables d'induire chez le poulet des leucémies myéloblastiques et érythroblastiques isolées.

Dans la suite de ce paragraphe, nous aborderons uniquement le gène *C-MYB*. Ce gène est porté par le chromosome 6 (6q22-q23). Ce gène est composé de 15 exons avec 6 exons alternatifs permettant l'expression de 6 variants d'épissage (O'Rourke & Ness, 2008) possédant tous le même domaine de liaison à l'ADN mais une extrémité C-terminale propre. *C-MYB* code pour un facteur de transcription de 75 kDa comprenant un domaine de liaison à l'ADN, un

domaine de transactivation et un domaine de régulation négative (DRN) (Sakura *et al*, 1989) (Figure 13). Il se lie à la séquence t/cAAcT/gG appelée MYB Binding Site (MBS) (Biedenkapp *et al*, 1988) via son domaine de liaison à l'ADN qui est composé d'une répétition d'une cinquantaine d'acides aminés formant une structure hélice-tour-hélice.



Figure 13: La protéine MYB (Issu de Blood, Volume 117, Quelen et coll., 2011)

Il semble que l'activation des gènes par MYB nécessite surtout le domaine de transactivation qui permet de recruter des co facteurs parmi lesquels CEBP (CAAT enhancer binding protein), p300, les gènes de la famille *ETS* et *GATA1* (Bartůnek *et al*, 2003). Enfin le domaine répresseur situé en C-terminal comprend un domaine « leucine zipper » (LZ) intervenant dans la régulation transcriptionnelle négative par MYB de ses gènes cibles. Il a été démontré dans un modèle *in vitro* que la troncation de cette extrémité C terminale du gène *MYB* conduit à une activation constitutive du gène (Gonda *et al*, 1989). MYB a une demi vie courte et sa régulation post transcriptionnelle est soumise à différents phénomènes dont l'ubiquitynilation, la phosphorylation (Winn *et al*, 2003), l'acétylation et la sumoylation (Sramko *et al*, 2006). Par ailleurs la régulation de MYB dépend de voies de signalisation comme ERK (Extracellular signal-regulated kinase) ou PI3K (phosphoinositide 3-kinase) (Lauder *et al*, 2001). Plus récemment dans une étude d'immunoprécipitation avec séquençage d'ADN associé (Zhao *et al*, 2011), un profil de gènes régulés au niveau transcriptionnel par MYB a été élaboré. Au sein de ce profil, les gènes correspondant à la signature des cellules souches leucémiques, des progéniteurs hématopoïétiques et des voies de différenciation myéloïde étaient sur représentés. Si MYB active de nombreux gènes comme *GFII* et *MYC*, cette étude a permis de mettre en évidence que physiologiquement MYB réprime la moitié de ses gènes cibles et notamment

PU.1, RUNX1, JUNB et *CEBPB*. Par ailleurs, l'interaction avec p300 qui est connu comme un co-activateur de MYB est aussi nécessaire pour l'effet répresseur de MYB. Cette répression pourrait contribuer au rôle de MYB au niveau des cellules souches hématopoïétiques avec l'inhibition de la différenciation et le développement de l'auto-renouvellement (*Figure 14*).

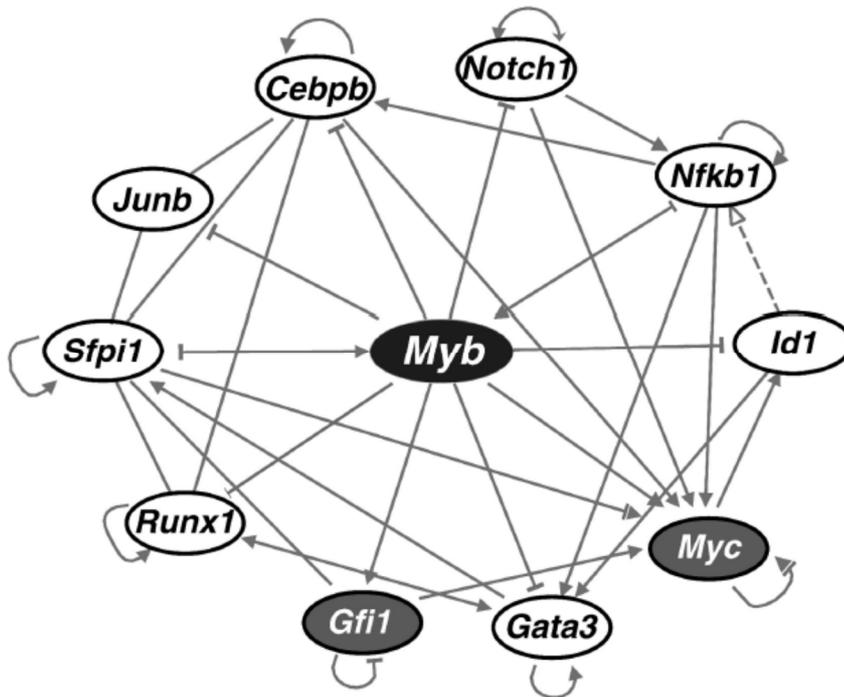


Figure 14: MYB et la régulation de ses gènes cibles impliqués dans l'hématopoïèse. (Issu de Nucleic acid Research, volume 39, Zhao et al., 2011).

Les principaux gènes cibles de MYB peuvent être classés en trois catégories :

- Les gènes « de ménage » comme *GSTM1* (glutathione-S-transferase M1) ou *MAT2A* (methionine adenosyltransferase 2a)
- Les gènes spécifiques de lignées ou de fonction comme *ELA2* (Neutrophil elastase)
- Les gènes impliqués dans l'oncogénèse comme notamment *MYC*, *CCNA1* (cycline1), *BCL-2* ou *GATA3*.

Depuis de nombreuses années, MYB a été identifié comme un gène clé de l'hématopoïèse (Lipsick & Baluda, 1986). Il régule ainsi l'hématopoïèse physiologique par son implication dans la prolifération, la survie et la différenciation (cette dernière étape étant permise par la diminution de son expression) des cellules hématopoïétiques. Ce rôle a été démontré par la mort de souris KO pour le gène *MYB* par anoxie dès le 15^{ème} jour de vie intra embryonnaire. Ces souris présentaient une anémie sévère et de multiples défauts dans les autres lignées hématopoïétiques (Mucenski *et al*, 1991) alors que le développement des autres organes était normal.

Contrairement à *GATA1*, *MYB* est exprimé aux stades précoces de l'hématopoïèse et son expression diminue au cours de la différenciation. Cela a été démontré notamment par l'induction de la différenciation dans la lignée d'érythroleucémie murine MEL qui s'associe à une diminution de l'expression de *MYB* (Ramsay *et al*, 1986). En outre, il a été mis en évidence que MYB joue un rôle essentiel dans le maintien des cellules souches hématopoïétiques en utilisant un modèle de souris KO conditionnel pour MYB. Ainsi, dans un modèle murin d'inactivation conditionnelle de MYB on a pu observer une diminution de l'auto-renouvellement des cellules souches accompagnée d'une accélération de la différenciation (Lieu & Reddy, 2009). Enfin, il est important de noter que son promoteur possède deux sites de liaison à *GATA1* permettant une inter-régulation de ces facteurs de transcription au cours de la différenciation.

MYB est impliqué dans divers tissus en pathologie dont le sein et le colon. Au niveau hématopoïétique, MYB est également impliqué dans la leucémogénèse, particulièrement myéloïde. Dans des modèles *in vitro*, l'inactivation de MYB a démontré l'importance de ce dernier dans la prolifération cellulaire et dans la viabilité à long terme de ces cellules que ce soit dans des modèles cellulaires de leucémie aiguë ou chronique (Calabretta & Gewirtz, 1991). Une étude a mis en évidence chez des patients thalassémiques présentant une hémoglobine

foétale élevée, une diminution de l'expression de *MYB*. Cette diminution entraînerait une modification de la prolifération cellulaire et notamment une accélération de la différenciation érythroïde ce qui entraînerait une augmentation de γ -globine et, par conséquent, une persistance d'hémoglobine foétale (HbF) du fait d'un switch incomplet des gènes foétaux vers les gènes adultes. Ainsi, il a été démontré que des polymorphismes de *MYB* interviennent dans les taux variables d'HbF, et que MYB exerce une régulation négative sur l'expression de γ -globine (Jiang *et al*, 2006).

GATA1

GATA1 est la première à avoir été étudiée d'une famille de protéines GATA dont six sont actuellement connues et dont les trois premières sont exprimées majoritairement au niveau du système hématopoïétique (Ferreira *et al*, 2005). GATA4, GATA5 et GATA6 étant exprimées dans divers tissus dont le cœur et les organes digestifs. Le nom de GATA est dû au fait que ces facteurs se fixent spécifiquement sur une séquence consensus, (A/T)GATA(A/G) (ou WGATAR en code FASTA) de l'ADN. La séquence consensus complète existe au niveau du promoteur de nombreux gènes, en particulier les gènes de globine, les gènes codant pour les enzymes de la synthèse de l'hème ou les protéines de membrane du globule rouge, ainsi que pour l'érythropoïétine et son récepteur.

Le gène codant le facteur GATA1, dont le rôle a été largement décrit dans les lignées érythrocytaires et mégacaryocytaires, est situé sur le chromosome X en Xp11-11.23. La protéine de 43 kDa est composée de 413 acides aminés et contrôle l'expression de nombreux gènes dans de nombreuses lignées cellulaires. Trois domaines fonctionnels ont été identifiés au niveau de la protéine GATA1 : un domaine d'activation à l'extrémité N-terminale, et deux doigts de zinc, désignés comme N (N-finger) et C (C-finger) (*Figure 15*). Le doigt de zinc C reconnaît les séquences GATA typiques (motif WGATAR). Le doigt de zinc N semble être un

domaine d'activation et de stabilisation. Il permet l'interaction protéine-protéine et notamment la liaison à différents facteurs de transcription (fixation de PU.1 impliquée dans la différenciation myéloïde et liaison à EKLf pour la différenciation érythroïde). Il se lierait aussi à l'ADN, en particulier à des séquences dites palindromiques, cette liaison étant importante pour sa fonction de stabilisation. De tels motifs existent dans de nombreuses régions promotrices, et jouent un rôle essentiel dans le développement des éosinophiles. Il semble aussi que le doigt N puisse se lier à une séquence atypique de type GATC.

GATA1 est essentiel à une érythropoïèse normale. Les souris chez lesquelles le gène a été invalidé meurent fortement anémiques à mi-gestation à J12,5 (Takahashi *et al*, 1997). En culture, les cellules ne dépassent pas le stade de proérythroblastes (Pevny *et al*, 1995). Au cours de l'érythropoïèse, GATA1 participe également à la prolifération en régulant négativement la transcription de certains gènes et notamment MYB (Bartunek *et al*, 2003). En outre, une étude de Chromatin Immuno Precipitation–Sequencing (CHIP-Seq) a permis de mettre en évidence les nombreuses cibles directes de GATA1 dans un modèle murin d'érythro-leucémie que ces cibles soient activés ou réprimés par GATA1 (Yu *et al*, 2009). De la même manière, GATA1 est essentiel au développement de la lignée mégacaryocytaire. Son absence entraîne une prolifération et un déficit de maturation des mégacaryocytes, en même temps qu'une diminution du nombre de plaquettes (Shivdasani *et al*, 1997). GATA1 est enfin nécessaire au développement des éosinophiles puisque la délétion de 2 sites de liaison GATA à haute affinité au niveau de son promoteur aboutit à une disparition des éosinophiles (Yu *et al*, 2002) et contribue à la différenciation terminale mastocytaire (Harigae *et al*, 1998). Une autre caractéristique majeure de GATA1 est l'interaction avec d'autres protéines. Le doigt N, en particulier, recrute le facteur FOG1 (*Friend of GATA*) qui est, comme GATA1, exprimé dans les cellules hématopoïétiques, et dont l'interaction avec GATA1 est absolument essentielle au

développement des globules rouges et des mégacaryocytes, mais non des éosinophiles (Tsang *et al*, 1997).

Enfin, il a été montré que les séquences GATA existent également dans la région promotrice du gène *GATA1* lui-même ainsi que dans celles de *GATA2*, dont l'expression diminue lorsque *GATA1* est activé. On observe, de ce fait, une persistance de l'expression de *GATA2* en cas d'inactivation de *GATA1* (phénomène de « GATA Switch »). Durant toutes ces étapes, *GATA1* est capable de s'autoréguler afin de maintenir son expression en se fixant sur des sites GATA situés dans son promoteur après dimérisation via son doigt de zinc N terminal (Mackay *et al*, 1998). De plus, son activité transcriptionnelle peut être modulée par des interactions avec des co-facteurs comme CBP (CREB Binding Protein)/p300 (Blobel *et al*, 1998).



Figure 15: La protéine GATA1 (Issu de Blood, Volume 117, Quelen et coll., 2011). AD : Domaine d'activation ; ZnF : Zinc Finger (doigts de zinc)

Il existe des mutations de GATA1 conduisant à des anomalies de l'hématopoïèse. Ainsi il a été mis en évidence, des mutations de GATA1 survenant au niveau du doigt de zinc N-terminal. Nichols et coll., ont mis en évidence une anémie dysérythropoïétique familiale, accompagnée d'une thrombocytopénie liée à une substitution valine→méthionine au niveau du résidu 205 de GATA1 (V205M). Cette valine est essentielle à l'interaction avec FOG1 (Nichols *et al*, 2000). D'autres mutations impactant l'association GATA1/FOG1 ont été identifiées depuis provoquant une macrocytopénie (Freson *et al*, 2001), une thrombopénie isolée (Mehaffey *et al*, 2001) ou associée à une thalassémie (Yu *et al*, 2002). On peut également citer les LAM des patients trisomiques 21.

GATA2

Il appartient à la famille GATA et tout comme GATA1 joue un rôle dans l'hématopoïèse surtout au niveau des progéniteurs précoces et des lignées mégacaryocytaires et mastocytaires. Il est également exprimé au niveau des cellules endothéliales et du système nerveux central. Il est localisé au niveau du chromosome 3 et possède 6 exons. Le phénomène de « GATA switch » décrit initialement lors de l'érythropoïèse, a récemment été décrit également lors de la différenciation mastocytaire. En effet, Cantor et al. (Cantor *et al*, 2008), ont mis en évidence que FOG1 était lié à GATA2 lors du processus de maturation mastocytaire normal (ce site étant normalement occupé par GATA1 dans la différenciation érythroïde) et ont évoqué un phénomène de GATA switch. GATA2 est un facteur de transcription important de l'hématopoïèse et les embryons de souris GATA2^{-/-} meurent précocement à J10 avec une déplétion des progéniteurs hématopoïétiques. Par ailleurs GATA2 est important pour la prolifération et l'expansion des CSH puisque ces capacités sont augmentées par une hyper expression de GATA2 (Tipping *et al*, 2009). Le mécanisme semble sous tendu par les interactions existant entre GATA2, FLI1 et SCL (Pimanda *et al*, 2007). GATA2 semble également important lors de la différenciation mégacaryocytaire durant laquelle il est fortement exprimé (Terui *et al*, 2000). A l'inverse, la diminution d'expression de GATA2 semble être responsable du développement d'aplasie médullaire (Fujimaki *et al*, 2001). Par ailleurs, GATA2 se lie également à PU.1 provoquant une diminution relativement importante de son expression et des gènes myéloïdes régulés par ce dernier (Chou *et al*, 2009). Enfin, il a été récemment montré (Baba *et al*, 2012) que GATA2 est un activateur important du promoteur de IL1RL1/ST2 dans le processus de différenciation basophile/mastocytes.

MITF

MITF est le *mi*-transcription factor (microphthalmia associated transcription factor). Le locus *mi* code pour une protéine de la famille des facteurs de transcription bHLH-Zip (basic-helix-leucine zipper). MITF est préférentiellement exprimé dans les mastocytes, mélanocytes, ostéoclastes, cellules NK et B. De nombreux mutants existent au niveau du locus *mi* et sont associés à diverses pathologies. Très tôt dans un modèle murin, la mutation de ce locus a été associée à une baisse des mastocytes et à des anomalies de leur phénotype (Ebi *et al*, 1990). Depuis, de nombreuses autres mutations et autres modèles murins ont été étudiés renforçant le rôle de MITF dans la maturation mastocytaire. Ainsi, Kim et coll., (Kim *et al*, 1999) ont mis en évidence un déficit de l'expression de Granzyme B et de tryptophane hydroxylase dans les mastocytes produits dans un modèle murin exprimant les mutations *Mi^{or}* et *Mi^{wh}*. De la même manière, il existait dans ce modèle une décroissance du nombre de mastocytes au niveau cutané. Plus récemment, il a été montré que MITF était particulièrement impliqué dans la migration, le phénotype et la survie des mastocytes (Kitamura *et al*, 2006).

Régulation de la basophilopoïèse

La basophilopoïèse fait intervenir de nombreuses molécules dont certaines cytokines décrites précédemment. Par ailleurs, comme au niveau de l'hématopoïèse, de nombreux facteurs de transcription interviennent et coopèrent dans ce processus. Parmi les plus importants, on trouve IRF8 (Interferon regulatory factor 8), CEBPA, GATA1, GATA2, IKZF1 (Ikaros family Zinc finger-1), RUNX1 (runt-related transcription factor 1) et STAT5 (signal transducer and activator of transcription-5). En 2015, une étude a permis de mettre en évidence qu'IRF8 est exprimé dans les progéniteurs granuleux mais pas dans les stades ultérieurs de différenciation basophile. Par ailleurs, dans cette même étude, il a été mis en évidence chez la souris que GATA2, qui est important dans la différenciation basophile, est contrôlé par IRF8 et que des

cellules provenant de souris IRF8 $-/-$, ont une capacité diminuée pour produire des basophiles ou des mastocytes, renforçant le rôle d'IRF8 au stade précoce de la basophilopoïèse (Sasaki *et al*, 2015).

Les GMP expriment des facteurs de transcription clés que sont notamment CEBPA, IKZF1, STAT5 et IRF8 et peuvent générer des cellules éosinophiles, mastocytaires, neutrophiles et macrophagiques en fonction de différents mécanismes de régulation (Arinobu *et al*, 2005; Iwasaki *et al*, 2006; Qi *et al*, 2013; Li *et al*, 2015; Sasaki *et al*, 2015). Ainsi, si l'on considère la branche des pré-BMP (Pre Basophil and Mast cell progenitor), l'expression d'IRF8, décroît alors que l'expression de STAT5, CEBPA et GATA2 augmente. D'un autre côté, si l'on considère la voie conduisant à la production de BMCPs (basophil/mast cell progenitors), à la diminution d'IRF8 s'associe une décroissance de CEBPA alors que l'expression de GATA1, GATA2 et IKZF1 augmente. Pour illustrer cela, il a été démontré qu'une délétion bi-allélique de GATA2 conduit *in vitro* à une diminution importante du nombre de basophiles et de cellules mastocytaires alors qu'une délétion mono-allélique conduit uniquement à une diminution des mastocytes (Qi *et al*, 2013). A l'inverse l'expression forcée de GATA2 dans des modèles murin STAT5 $-/-$ restaure le développement des mastocytes et des basophiles. De la même façon, il a été démontré chez des souris déficientes en IKAROS une augmentation des basophiles et des BaPs (basophils progenitors) présents dans la moelle ce qui fait d'IKZF1 un régulateur négatif du développement des basophiles (Rao *et al*, 2013). Ainsi, le niveau d'expression de ces facteurs de transcription parmi lesquels GATA2, CEBPA, IKZF1 ou IRF8 est important pour la régulation de la maturation des basophiles. Par ailleurs, l'ordre d'expression de ces derniers, est également important et conditionne la voie de maturation prise par les progéniteurs.

En effet, au cours du processus de maturation, lorsqu'il existe une augmentation de GATA2, associée à la diminution de CEBPA les progéniteurs de type GMP donnent naissance aux précurseurs mastocytaires et basophiles, les BMCPs. Par la suite, si le niveau d'expression de

CEBPA est augmenté, les précurseurs s'orientent vers la lignée basophile et si CEBPA est délété, les précurseurs s'orientent alors vers la lignée mastocytaire (Arinobu *et al*, 2005). En ce qui concerne la voie des pré-BMP, le même genre de phénomène peut être observé. En effet, dans un modèle murin déficient en STAT5, on observe une diminution de l'expression de CEBPA. Par ailleurs, l'augmentation de CEBPA normalement constatée lorsque des GMP sont cultivés en présence d'IL-3, n'est pas observée à partir de GMP provenant de ce modèle murin ce qui fait de STAT5 un élément déterminant dans la production de basophiles à partir du stade pré-BMP. Dans ce même modèle, les auteurs ont mis en évidence la régulation croisée de CEBPA et MITF puisque la perte de CEBPA augmente l'expression de MITF dans les basophiles orientant les cellules vers les mastocytes alors que la perte de MITF augmente l'expression de CEBPA dans les mastocytes les orientant vers la basophilie. Par ailleurs, MITF se fixe sur le promoteur de CEBPA pour inhiber sa transcription et l'inverse est observé pour CEBPA qui se fixe sur le promoteur de MITF. (Qi *et al*, 2013)

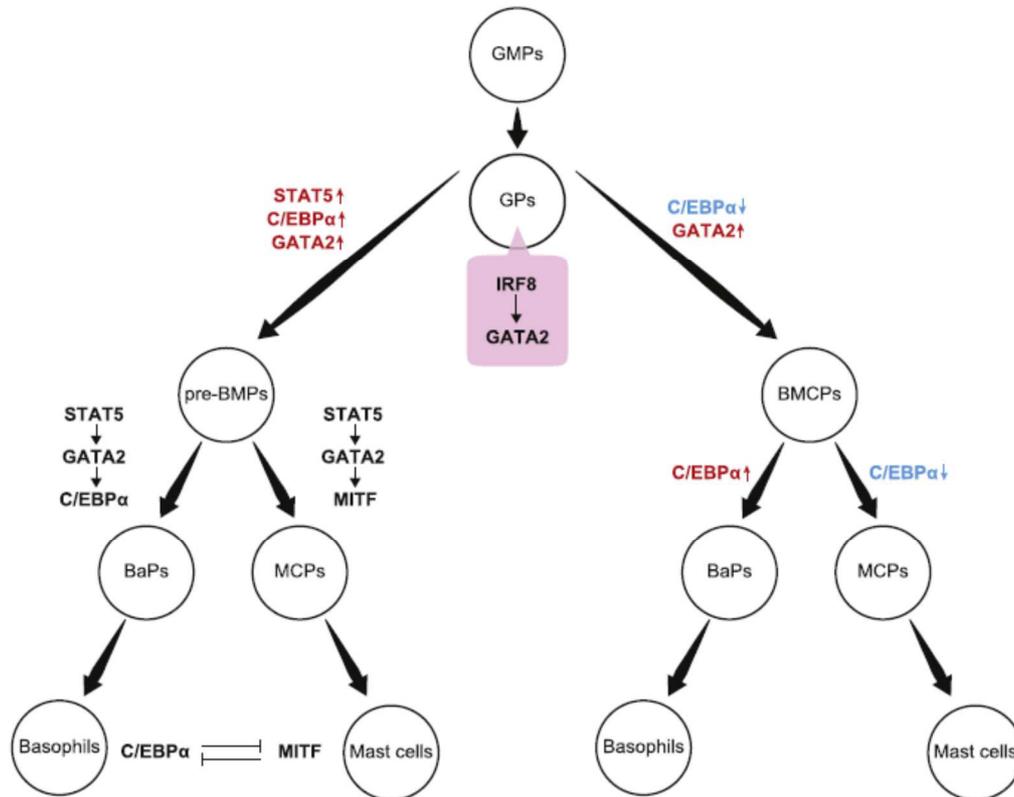


Figure 16: Modèle de régulation du développement des basophiles et des mastocytes par les facteurs de transcription.

IRF8 exprimée dans les GMP et les GP induit l'expression de *GATA2*. Lorsque la différenciation se fait vers les BMCPs, l'expression de *GATA2* est augmentée et celle de *CEBPA* est diminuée. Quand la différenciation s'oriente vers les pré-BMPs, l'expression de *STAT5*, *CEBPA* et *GATA2* est augmentée. Les BMCPs se différencient en BaP après ré augmentation de *CEBPA* alors qu'ils se différencient en MCP si *CEBPA* reste non exprimé. Dans les pré-BMPs et les stades de maturations suivants, l'axe *STAT5-GATA2* induit l'expression de *CEBPA* et *MITF* qui induisent a différenciation vers les BaP ou MCP respectivement. (Issu de *allergology International*, Sasaki, 2016)

Par ailleurs, Nei et coll. (Nei *et al*, 2013) ont démontré l'importance de *GATA1* dans la poursuite de la différenciation de la voie basophile. Ainsi ils ont démontré que les cellules basophiles exprimaient de forts niveaux d'ARNm de *GATA1* et l'utilisation de si-RNA éteignant l'expression de *GATA1* résultait en une diminution de la production d'IL-4 en réponse à la stimulation d'IgE. En outre des souris portant une délétion d'une région enhancer de *GATA1*, contenant un site double *GATA* de haute affinité au niveau du promoteur *GATA1* ont une diminution du nombre de basophiles en intra-médullaire et une diminution du nombre de basophiles lorsqu'ils sont mis en culture avec de l'IL-3. Par ailleurs, il existe une diminution de la dégranulation et de la sécrétion d'IL-4 et IL-6 après stimulation par IgE.

Bases moléculaire de la leucémogénèse

Après avoir resitué les mécanismes et les principaux acteurs de l'hématopoïèse et de la basophilopoïèse physiologiques, nous nous intéresserons à leurs dérèglements aboutissant aux leucémies. Dans les dernières décennies, l'évolution des techniques d'analyse biologique et le développement de la biologie moléculaire et de la cytogénétique ont permis une amélioration de la compréhension de la leucémogénèse et des anomalies impliquées dans les voies de signalisation. Ainsi il existe dans 80 % des cas des anomalies chromosomiques clonales acquises, des mutations (FLT3, NPM1, WT1,...) ou des hyperexpressions géniques (WT1, EVI1,...) jouant un rôle dans la leucémogénèse et ayant un impact pronostique. Il existe une accumulation d'anomalies génétiques notamment au niveau des progéniteurs de l'hématopoïèse aboutissant à des anomalies clonales ayant des fonctions de renouvellement, de prolifération et de différenciation dérégulées. Les nouvelles techniques de biologie moléculaire ont ainsi permis de mettre en évidence des mutations essentielles au développement leucémique. Ainsi en 2012, Welsh et coll. (Welch *et al*, 2012) ont proposé un modèle de leucémogénèse reposant sur la coopération de plusieurs types de mutations. En premier lieu les progéniteurs hématopoïétiques seraient le lieu de mutations bénignes appelées « passager » qui s'accumuleraient au fur et à mesure du temps sans avoir par elles-mêmes de conséquence pathologique. A ces mutations s'ajouteraient des mutations dites « driver » qui seront soit initiatrices (première mutation type NPM1, DNMT3A, IDH1...) soit coopératrices (seconde mutation driver apparaissant type FLT3) et coopéreront avec les mutations « passager » accumulées de manière à aboutir à la formation d'un clone leucémique fondateur.

(Figure 17)

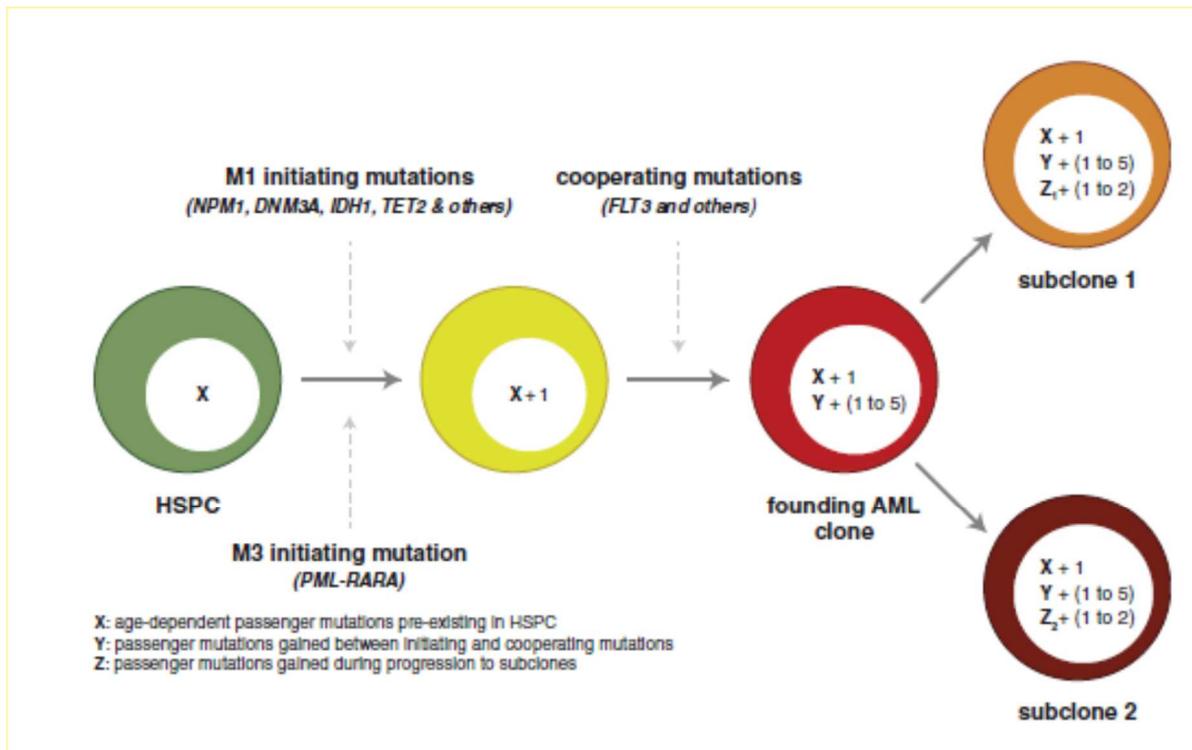


Figure 17: Modèle intégré sur l'origine des mutations « driver » et « passager » durant la leucémogénèse. Les CSHs accumulent des mutations aléatoires, bénignes. «X» représente ces mutations qui peuvent aller de 100 à 1000 en fonction de l'âge. Les mutations initiales confèrent un avantage aux cellules affectées, et les mutations coopérantes donnent un nouvel avantage prolifératif aux clones affectés. Un à cinq événements pourraient coopérer avant d'aboutir au développement d'une leucémie aiguë. (Issu de Cell, Volume 150, Welch, 2012).

Ainsi, le développement d'une LAM résulte de l'accumulation de plusieurs anomalies moléculaires secondaires à des mutations ou des translocations qui vont être présentes dès le diagnostic sous forme de différents sous-clones. Ces clones pourront être à l'origine d'une rechute soit par adaptation du clone principal ayant acquis de nouvelles mutations qui aboutiront à sa réémergence, soit par le développement d'un sous-clone minoritaire au diagnostic mais résistant aux chimiothérapies utilisées (Ding *et al*, 2012). (Figure 18)

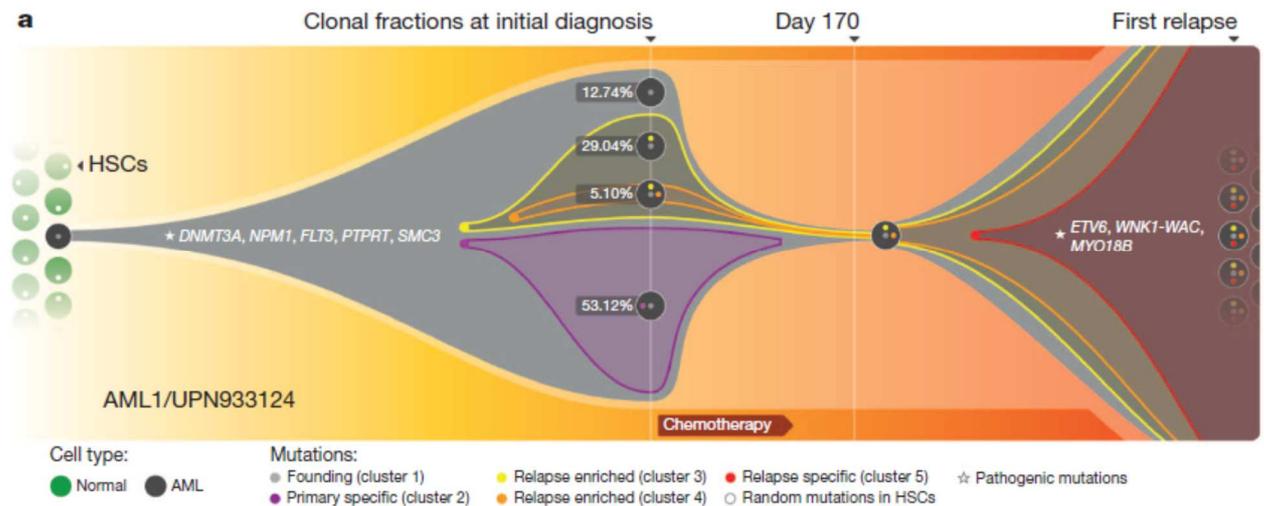


Figure 18: Représentation graphique de l'évolution clonale de la première tumeur à la rechute et screening de l'évolution dans 8 cas appariés de cancer primaire avec rechute. Le clone fondateur de la tumeur primaire contient des mutations somatiques de DNMT3A, NPM1, PTPRT, SMC3 and qui sont récurrentes dans les LAM. Un sous-clone à l'intérieur de la tumeur primaire évolue pour devenir le clone dominant à la rechute en acquérant des mutations additionnelles d'ETV6 and MYO18B, et un gène de fusion WNK1-WAC. Issu de Nature, Volume 481, Ding et coll., 2012)

Nous allons maintenant détailler le rôle des principaux facteurs de transcription et des molécules intervenant dans le mécanisme de la leucémogénèse.

CEBPA

Son importance dans l'hématopoïèse normale explique son rôle dans la leucémogénèse lorsqu'il est altéré. Ainsi, de nombreuses études ont mis en évidence des mutations de CEBPA dans les LAM. (Leroy *et al*, 2005; Benthaus *et al*, 2008)

En effet, CEBPA est souvent la cible de protéines de fusion issues de translocations comme BCR-ABL1 ou AML1-ETO qui sont responsables d'une diminution d'expression de ce dernier. Cependant il peut également être touché par des mutations qui sont de 2 types, les mutations tronquant la partie N-terminale et les mutations du domaine leucine zipper au niveau C-terminal. Ces deux types sont fréquemment associés. Ces mutations sont présentes chez 4 à 11% des patients adultes et chez 4,5% des patients pédiatriques. Dans ces deux groupes, ces mutations sont associées à un pronostic plus favorable sur la survie (Ho *et al*, 2009). CEBPA peut également être l'objet de modifications post transcriptionnelles. Ainsi il a été démontré sur

des cellules de lignées et sur des cellules de patients avec mutation FLT3 que CEBPA était inactivé suite à des modifications de phosphorylation médiées par ERK1/2 (Radomska *et al*, 2006).

MYB

Très tôt des études ont rapporté l'implication du gène MYB et d'anomalies au niveau de son locus dans le développement de leucémies ou de lymphomes mais il s'agissait d'anomalies très rarement retrouvées qui ont surtout mis en évidence son rôle potentiel dans la leucémogénèse lymphoïde (Barletta *et al*, 1987). En 2007, 2 équipes ont rapporté l'existence d'anomalies chromosomiques récurrentes (duplications et translocations) impliquant MYB chez des patients développant des leucémies aiguës lymphoblastiques T (Clappier *et al*, 2007; Lahortiga *et al*, 2007). Dans les cas avec translocations, les loci de MYB et du récepteur T étaient juxtaposés aboutissant à une surexpression de MYB dans les cellules leucémiques (Clappier *et al*, 2007). Dans une autre étude portant sur 107 patients 8,4% des sujets atteints d'une LAL-T étaient porteurs d'une duplication acquise de *MYB* impliquée dans le blocage de différenciation des lymphocytes. Cette duplication semble médiée par des éléments Alu qui sont proches du locus MYB (Lahortiga *et al*, 2007). De la même façon, des anomalies récurrentes du nombre de copies de MYB ont été rapportées chez des patients ayant une LAM avec translocation t(8;16) impliquant MYST3 et CREBBP (Murati *et al*, 2009).

Par ailleurs, il semble y avoir un rôle de « co-facteur » de MYB dans l'induction et le maintien de la leucémogénèse. En effet, parmi les éléments clés de la leucémogénèse il existe les gènes de fusion MLL qui sont responsables de dérégulations au niveau épigénétique. Ainsi dans un modèle *in vitro* étudiant l'oncogène MLL-ENL, il a été démontré que MYB était une cible des gènes HOXA9 et Meis1 participant ainsi au développement de la leucémogénèse (Hess *et al*, 2006). Depuis, plusieurs études ont confirmé ce rôle (Somerville *et al*, 2009) et la possibilité

d'inhiber le rôle de MLL-ENL en utilisant un si-RNA responsable du knockdown de MYB. De la même manière, dans un modèle murin de LAM, l'utilisation d'un si-RNA ciblant la protéine de fusion MLL-AF9 est responsable d'une diminution de MYB et il a été mis en évidence que le promoteur de MYB était occupé par la protéine de fusion (Zuber *et al*, 2011). Par ailleurs dans ce modèle murin, il a été démontré que l'inhibition ciblée de MYB était associée à une rémission de la LAM et que ce dernier était essentiel à la maintenance des cellules leucémiques et qu'il participait à leur auto-renouvellement. De la même façon, il a été montré *in vitro* que MYB est essentiel à la maintenance des cellules leucémiques et que son inhibition est responsable d'une diminution des cellules souches leucémiques (Somerville *et al*, 2009).

Enfin, si MYB n'est pas directement lié à certaines de ces anomalies, de nombreux gènes cibles de MYB peuvent être dérégulés par l'existence de certaines translocations comme c'est le cas de RUNX1-RUNX1T1 (Pattabiraman *et al*, 2014).

Le rôle de MYB dans la leucémogénèse peut donc être résumé selon la figure suivante (*Figure 19*).

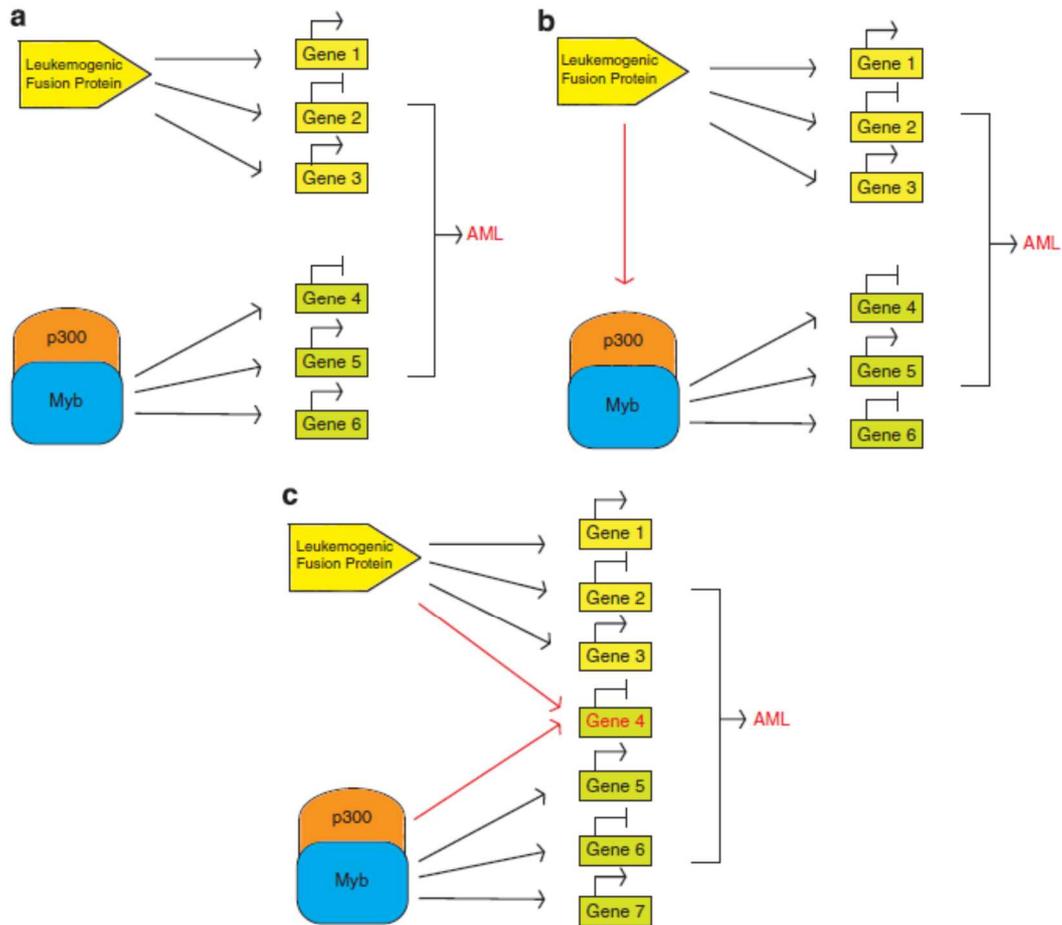


Figure 19: Modèle illustrant 3 possibles relations entre des protéine de fusion et MYB pouvant aboutir une leucémie après régulation de différents programmes transcriptionnels. (a) MYB et la protéine de fusion régulent de manière indépendante un panel de gènes. (b) MYB est régulé par la protéine de fusion tandis que dans (c) les gènes aboutissant à la leucémogénèse sont corégulés par MYB et la protéine de fusion. (Issu de *Leukemia*, Volume 27, (Pattabiraman & Gonda, 2013))

GATA1

Ce gène n'a jamais été retrouvé impliqué dans des translocations en dehors de la t(X;6) qui a été décrite en 2011 par Quelen et coll. (Dastugue *et al*, 1997; Quelen *et al*, 2011) qui est le modèle leucémique étudié dans ce travail et que nous décrivons de manière plus détaillée ultérieurement.

En revanche, il existe des mutations dans le domaine d'activation N-terminal de GATA1 et le doigt de zinc N terminal qui ont été décrits dans des leucémies. C'est le cas de mutations acquises qui sont associées à la myélopoïèse transitoire anormale (TAM) et à la leucémie aiguë

mégacaryoblastique (AMKL) chez les enfants présentant un syndrome de Down (Wechsler *et al*, 2002). Environ 20 % des enfants chez qui on a constaté une TAM à la naissance développent ultérieurement une leucémie de type AMKL. Plusieurs études ont proposé l'intervention de phénomènes d'altération génétique supplémentaires impliquant des voies de signalisations telles la famille des JAK kinases, MPL, SH2B3 (LNK) et RAS ou des régulateurs épigénétiques tels CTCF (20%), EZH2 et KANSL1 pour expliquer la progression de la TAM vers l'AMKL (Yoshida *et al*, 2013). Les mutations retrouvées génèrent un codon stop dans l'exon 2, empêchant la synthèse de la protéine entière. Seule est exprimée, grâce à un site d'initiation dans l'exon 3, une protéine GATA1 amputée de son extrémité N-terminale *transactivatrice*, GATA1s, incapable d'interagir avec d'autres facteurs de transcription tels GATA2, MYB, MYC, IKZF1 mais ayant conservé la capacité de liaison à FOG1 (Li *et al*, 2005). Par ailleurs, il a été montré que GATA1s favorise la prolifération mégacaryocytaire de manière plus importante qu'observée dans les modèles déficients en GATA1 (Toki *et al*, 2013). Récemment une étude a montré sur un modèle de cellules d'IPSC (induced pluripotent stem cells) que la coopération existant entre la trisomie 21 et la protéine GATA1s était responsable de l'augmentation de la production de cellules immatures capables d'évoluer vers des cellules blastiques. Il est possible que le rôle de la trisomie 21 soit lié à l'augmentation des facteurs de transcription RUNX1, ETS2 et ERG. (Banno *et al*, 2016)

FLT3

Il s'agit d'un récepteur à activité tyrosine-kinase, important pour l'hématopoïèse normale. En condition physiologique, la liaison du FLT3 ligand entraîne la dimérisation et l'autophosphorylation de son récepteur aboutissant à l'activation des voies PI3K/AKT et RAS/MAPK. En cas de mutation, la liaison au ligand n'est pas nécessaire pour activer ces voies de signalisation. Il existe 2 types de mutation FLT3 (Schmidt-Arras *et al*, 2009) :

- La duplication en tandem (FLT3-ITD ; 30% des cas), mutation gain de fonction résultant en une activation constitutive de FLT3 et une altération des voies d'aval incluant l'activation de la voie STAT5.

- Les mutations dans le TKD (tyrosine kinase domain) aboutissant à une activation constitutive de FLT3 sont plus rares.

KIT

Il s'agit du récepteur du SCF, présentant également une activité tyrosine kinase intrinsèque. La mutation de KIT va aboutir à une activation de ce récepteur à activité tyrosine-kinase résultant en la stimulation des voies MAPK et PI3K/AKT (mutation exon 8) ou des voies STAT3/STAT5 et PI3K/AKT (mutation codon 816). Ces mutations sont présentes notamment lors des LAM avec t(8;21) ou inv(16).

RAS

Les oncogènes RAS codent pour des petites protéines G relayant le signal de transduction de certains récepteurs membranaires. Parmi eux on retrouve NRAS qui agit sur les processus de prolifération, différenciation et apoptose et est muté dans 10% des cas de LAM de l'adulte (Bacher *et al*, 2006) et KRAS qui est muté dans 5% des cas seulement (Bowen *et al*, 2005).

NPM1

NPM1 est une phosphoprotéine essentielle à l'homéostasie cellulaire, qui régule la transcription et l'apoptose et est impliquée dans la stabilisation de TP53 et CDNK2A. Les mutations de NPM1 aboutissent à son accumulation cytoplasmique participant à la leucémogénèse (Falini *et al*, 2011) avec une perte de fonction de la protéine NPM normale et par le gain de nouvelles fonctions et notamment une inhibition excessive des caspases 8 et 9, l'ensemble aboutissant à

l'augmentation de l'autorenouvellement des cellules (Alcalay *et al*, 2005). Elles sont associées à un bon pronostic en l'absence de mutation FLT3.

RUNX1

RUNX1 peut être la cible de translocations comme la t(8;21)(q22;q22) dans les LAM ou la t(12;21)(p13;q22) dans 20 à 25 % des leucémies aiguës lymphoïdes de l'enfant, qui vont exercer une activité dominante et répressive sur les cibles de RUNX1 (Roumier *et al*, 2003). Par ailleurs, RUNX1 peut être altéré par des délétions, insertions ou mutations ponctuelles récurrentes qui sont principalement localisées dans le domaine runt. Il se trouve ainsi muté dans 10 à 20% des syndromes myélodysplasiques et des LAM (Harada & Harada, 2009).

DNMT3A

Comme nous l'avons vu précédemment, les mutations DNMT3A sont considérées comme un événement précoce dans la leucémogénèse. Il s'agit d'une DNA-méthyltransférase qui participe à la méthylation des cytosines contenues dans les îlots CpG en ciblant plutôt les régions non méthylées de l'ADN contrairement à DNMT1 qui participe au maintien des profils de méthylation préexistants. Cette méthylation a pour but de diminuer l'expression de certains gènes. On retrouve des mutations récurrentes dans 20% des cas de LAM ce qui en fait la 2^{ème} mutation la plus fréquente notamment dans les LAM monocytaires type M5 (Yan *et al*, 2011). Ces mutations vont ainsi participer au processus leucémogène en diminuant l'expression de gènes par hyperméthylation et en créant un déséquilibre génique. Il a été mis en évidence un lien entre le profil de méthylation de certains cas de leucémies et la présence de protéines chimériques telles RUNX1-RUNX1T1 (Figuerola *et al*, 2010).

Histones acétyltransférases (HAT) et désacétylases (HDAC)

De la même manière les modifications post-traductionnelles des histones sont sources d'une modification de structure de la chromatine capable de modifier l'expression génique. Les HAT et HDAC ainsi que les histones méthyltransférases (HMT) et déméthylases (HDM) sont les enzymes impliquées dans ce processus. Ainsi, l'acétylation des histones conduit à l'activation de l'expression des gènes tandis que la méthylation des histones peut conduire soit à une activation soit à une répression suivant les histones et les résidus méthylés. Certains gènes comme MLL, qui code pour une histone méthyltransférase spécifique de l'histone 3 et participe ainsi à la modification des histones peuvent être impliqués dans des translocations chromosomiques récurrentes. Ainsi les translocations chromosomiques les impliquant contribuent à la leucémogénèse par l'expression anormale d'enzymes modifiant la chromatine et permettant l'expression d'oncogènes. (Milne *et al*, 2002)

TET2

TET2 comprend 11 exons et s'étend sur plus de 150 kpb. La protéine TET2 est codée par les exons 3 à 11 et comporte 2002 acides aminés. Les mutations de *TET2* affectent toutes les régions du gène. Tous les types de mutations sont observés : insertions ou délétions avec décalage du cadre de lecture (frameshift), mutations affectant les sites d'épissage, mutations faux-sens et mutations non-sens. Il est muté dans un large panel d'hémopathies myéloïdes malignes variées (syndromes myélodysplasiques, polyglobulies de Vaquez, thrombocytémies essentielles, myélofibroses primitives, leucémie myélomonocytaire chronique, leucémie aiguë myéloblastique primitive et secondaire, mastocytoses...) avec une fréquence globale, qui peut être estimée à environ 15 % (Delhommeau *et al*, 2009).

IDH1 et IDH2

IDH1 et IDH2 sont des enzymes NADP dépendantes, dont les mutations ont été d'abord mises en évidence au niveau des gliomes (Yan *et al*, 2009). Leurs mutations (présentes également dans 15-20% des cas de LAM) conduisent à une accumulation de 2-hydroxyglutarate (2-HG) et entraînent des dérégulations épigénétiques qui sont potentiellement oncogéniques comme par exemple l'inhibition des fonctions enzymatiques de TET2. Elles sont également associées à une hyper-méthylation de l'ADN et un blocage de la différenciation myéloïde *in vitro* (Figuroa *et al*, 2010).

OBJECTIFS

Les travaux précédents (Quelen *et al*, 2011) ont étudié la leucémie aiguë à basophiles du nourrisson associée à une translocation t(X;6) qui aboutit au gène de fusion MYB-GATA1. Ils ont permis de mettre en évidence un réarrangement chromosomique déséquilibré avec destruction d'une partie du gène GATA1 résiduel. Ces travaux ont montré que dans les cellules blastiques, cette translocation conduisait à une perte d'expression complète de la protéine GATA1, les patients étant exclusivement de sexe masculin et donc dépourvus d'un second chromosome X qui porterait une allèle fonctionnel de GATA1. Par ailleurs, l'expression de la fusion MYB-GATA1 en même temps que l'extinction de GATA1 endogène dans les cellules hématopoïétiques murines entraîne une augmentation des capacités d'auto-renouvellement ainsi qu'une altération de la différenciation au profit de la lignée granuleuse. Cependant, ce modèle ne reproduisait pas la différenciation basophile bloquée caractéristique de la maladie.

Des expériences préliminaires de xéno greffe sur des souris NSG ont été réalisées. Des cellules CD34⁺ issues de sang de cordon et transduites avec des vecteurs exprimant MYB-GATA1 (associé à un rapporteur de type TdT tomato) et un sh GATA1 (associé à un rapporteur GFP) ou des vecteurs contrôles (associés aux mêmes rapporteurs TdT tomato et GFP) ont ainsi été injectées à des souris traitées préalablement par busulfan.

Après 12 semaines, les moelles des souris ont été récupérées et analysées. Les cellules hCD45⁺ ont été sélectionnées en fonction de l'expression de GFP, Tomato ou les deux et analysées en cytométrie de Flux. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence :

- Une expression plus importante du CD34 en présence de MYB-GATA1 et sh GATA1 par rapport aux cellules contrôles
- Une orientation vers la différenciation myéloïde en présence de MYB-GATA1 et sh GATA1 (augmentation expression de CD33⁺ et CD117)
- Une tendance à la différenciation basophile en présence de MYB-GATA1 et sh GATA1 (augmentation de l'expression de CD203c et FcεRI)

- Les mêmes variations d'expression ont été observées après analyse de cellules exprimant uniquement MYB-GATA1 (TdT tomato+), ce qui n'était pas le cas en présence de sh GATA1 seul.

Ainsi suite aux résultats de ces expériences de xéno greffes, compte tenu de l'impact de MYB-GATA1 seul et pour des raisons de faisabilité technique, nous avons décidé de nous concentrer sur l'analyse du rôle de MYB-GATA1 dans la survenue du phénotype particulier de cette leucémie et en particulier pour son aspect d'engagement vers la lignée basophile.

L'objectif de ce travail était donc de reproduire au mieux le phénotype spécifique de cette leucémie et en particulier pour son aspect d'engagement vers la lignée basophile ainsi que de tenter de comprendre quelles voies sont dérégulées en utilisant de nouvelles approches *in vitro* et *in vivo*, notamment des cellules CD34+ humaines.

Nous comptons pour cela étudier les cibles transcriptionnelles de MYB-GATA1, et préciser dans quelle mesure la dérégulation de ces cibles est responsable du phénotype observé.

Les hypothèses principales sur la fonctionnalité de la fusion sont une « exagération » de l'activation physiologique par MYB, du fait de la perte de son DRN ou bien la stimulation de cibles nouvelles en raison de la présence du second doigt de zinc de GATA1 qui pourrait rediriger la fixation de la chimère sur des promoteurs différents.

Pour se faire, MYB-GATA1 a été exprimé grâce à un vecteur lentiviral (exprimant aussi la protéine fluorescente dTomato). De multiples modèles cellulaires ont été étudiés :

- lignées hématopoïétiques pour lesquelles un potentiel de différenciation basophile a été décrit (UT-7)
- progéniteurs hématopoïétiques primaires CD34+ issus de sang placentaire (pour lesquels la technique de différenciation utilisée est celle décrite dans une communication de M.Arock).

A partir de ces lignées hématopoïétiques, cultivées dans des conditions cytokiniques de différenciation cellulaire particulières (Hermine et coll., 1992 ; Favre et coll., 1990) et des cellules CD34+ nous avons cherché à obtenir des cellules « poussées » vers la basophilie. Cette orientation basophile a été validée au niveau cytologique, cytométrique et transcriptionnel.

A partir des modèles cellulaires validés, nous avons établi une liste de gènes dérégulés par la présence de MYB-GATA1. Pour se faire, nous avons étudié par puces Agilent (*Human Gene expression 4x44K (Agilent)*) les variations d'expression de gènes cibles dans différents modèles exprimant la fusion MYB-GATA1. Les études transcriptomiques de ces différents modèles nous ont permis de sélectionner les gènes dérégulés par la présence de MYB-GATA1. Parallèlement à cette étude, nous avons également réalisé une étude transcriptomique sur puce Agilent nous permettant d'obtenir les gènes dérégulés par l'engagement dans la voie de différenciation basophile.

A la suite de ces deux expériences qui constituent la première étape de notre projet, nous avons sélectionné les gènes dérégulés nous semblant les plus pertinents pour contribuer au phénotype leucémique à différenciation basophile. Ces gènes ont été choisis parmi ceux qui étaient les plus dérégulés à la fois par la présence de MYB-GATA1 ET par la culture dans des conditions basophiles.

Nos critères étaient :

- la reproductibilité de la variation d'expression dans les différentes expériences et avec les différents modèles
- la dérégulation identique de ces gènes d'intérêt que ce soit lorsqu'ils sont mis en présence de MYB-GATA1 ou lorsque les cellules sont « poussées » vers la voie basophile par les conditions cytokiniques.

- la pertinence envisagée d'après les données scientifiques disponibles, à la fois compte tenu des données fonctionnelles (gène impliqué dans la leucémogénèse et/ou la basophilopoïèse) et de ses modes de régulation transcriptionnelle (cible connue de MYB et/ou de GATA1). Une première expérience sur la lignée HL-60 nous a confirmé la validité de ce modèle en montrant des gènes dérégulés par la différenciation basophile ainsi que par l'expression de MYB-GATA1 (et diminution de GATA1) dont par exemple l'histidine décarboxylase, enzyme critique dans la voie de synthèse de l'histamine.

Une liste de gènes a ainsi été établie, avec un ordre de priorité d'exploration. La régulation de l'expression de ces gènes dans nos conditions expérimentales a alors été précisée :

Dans un premier temps, nous avons cloné les promoteurs des gènes cibles en amont d'un gène rapporteur (luciférase). Ces constructions ont été co-transfectées avec le vecteur d'expression de MYB-GATA1 ou le même vecteur exprimant MYB sauvage ou MYB dont le DRN a été délété dans des cellules de lignées type HEK293. Ces expériences nous ont permis d'évaluer l'activation directe des promoteurs ou des régions régulatrices des gènes d'intérêt par MYB-GATA1. Par ailleurs cela nous a permis de savoir si cette activation correspondait simplement à une « exagération » de l'activation physiologique par MYB, dans quelle mesure celle-ci était équivalente à celle que permet d'obtenir MYB sans DRN ou si l'activation par MYB-GATA1 constitue un phénomène nouveau, spécifique de la fusion tandis que le promoteur n'est pas activé par MYB normal ou délété. En effet, la persistance du domaine de liaison à l'ADN de GATA1 peut conférer à la fusion des propriétés d'activation de nouveaux promoteurs.

L'activation d'un promoteur contrôlant un gène rapporteur dans le cadre de co-transfection peut ne pas reproduire la réalité physiologique du gène cible dans son contexte chromatinien. Afin de confirmer le rôle direct de MYB-GATA1, par comparaison à MYB

sauvage ou MYB sans DRN, dans la fixation du promoteur de nos gènes cibles, nous avons exprimé nos facteurs de transcription dans des cellules de lignées hématopoïétiques.

Enfin, pour étudier les anomalies induites par la protéine de fusion MYB-GATA1, nous avons étudié sa stabilité au cours du temps en la comparant notamment à la protéine MYB native.

Ces travaux font l'objet de l'article ci-après, actuellement en cours de révision.

***MYB-GATA1* fusion promotes basophilic leukaemia: involvement of IL-33 and nerve growth factor receptors**

Stéphane Ducassou^{1,2}, Valérie Prouzet-Mauléon¹, Marie-Céline Deau¹, Philippe Brunet de la Grange³, Bruno Cardinaud^{1,8}, Hayssam Soueidan¹, Cathy Quelen⁴, Pierre Brousset⁴, Jean-Max Pasquet⁵, François Moreau-Gaudry⁵, Michel Arock⁶, François-Xavier Mahon^{1,7} and Eric Lippert^{5,9}.

1: ACTION Laboratory, INSERM Unit 1218, University of Bordeaux

2: Unité d'hématologie oncologie pédiatrique, CHU de Bordeaux

3: Laboratoire R&D d'Ingénierie Cellulaire, Etablissement Français du Sang – Aquitaine Limousin, CIRID UMR5164, University of Bordeaux

4: Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, INSERM U1037, Toulouse

5: Equipe thérapie génique, INSERM U 1035 Biothérapie des maladies génétiques et cancers, University of Bordeaux

6: Laboratoire d'Hématologie, CHU Pitié-Salpêtrière, Paris, France.

7: Bergonié Cancer Institute, INSERM Unit 916, University of Bordeaux

8: Bordeaux INP, F-33000 Bordeaux, France

9: CHU de Brest and INSERM U1078, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France

Running title: *MYB-GATA1* and basophilopoiesis

Corresponding author present address: Eric Lippert, Laboratoire d'Hématologie, CHU de Brest, Boulevard Tanguy Prigent, 29200 Brest, France. E-mail : eric.lippert@chu-brest.fr

The authors declare no relevant conflict of interest.

Figures: 6

Abstract: 194 words

Words count: 3747 words

Raw and normalized data were deposited on the Gene Expression Omnibus (series GSE72913)

Abstract:

Acute basophilic leukaemia (ABL) is a rare subtype of acute myeloblastic leukaemia. We previously described a recurrent t(X;6)(p11;q23) translocation generating a *MYB-GATA1* fusion gene in male infants with ABL. To better understand its role, the chimeric MYB-GATA1 transcription factor was expressed in CD34-positive hematopoietic progenitors which were transplanted into immunodeficient mice. Cells expressing MYB-GATA1 showed increased expression of markers of immaturity (CD34), of granulocytic lineage (CD33, CD117) and of basophilic differentiation (CD203c, FcεRI). UT-7 cells also showed basophilic differentiation after *MYB-GATA1* transfection. A transcriptomic study identified 9 genes deregulated by both MYB-GATA1 and by basophilic differentiation. Induction of three of these genes (*CCL23*, *IL1RL1* and *NTRK1*) was confirmed in MYB-GATA1-expressing CD34-positive cells by RTqPCR. IL-33 and NGF (Nerve Growth Factor), the ligands of IL1RL1 and NTRK1, respectively, enhanced the basophilic differentiation of MYB-GATA1-expressing UT-7 cells, thus demonstrating the importance of this pathway in basophilic differentiation of leukemic cells and CD34 positive primary cells. Finally gene reporter assays confirmed that MYB and MYB-GATA1 activated NTRK1 and IL1RL1 transcription leading to basophilic skewing of the blasts. Our results highlight the role of IL-33 and NGF receptors in basophilic differentiation of normal and leukemic cells.

Key words: Basophils; MYB-GATA1; Leukaemia; IL1RL1; NTRK1

Introduction:

Acute Myeloblastic Leukaemias result from acquired genetic abnormalities that typically increase proliferation and block differentiation of affected hematopoietic progenitors. Many of these genetic abnormalities are recurrent, and some form the basis of the WHO classification of leukaemias [1]. We previously described a rare specific basophilic leukaemia occurring in male infants characterized by a recurring t(X;6)(p11;q23) translocation [2]. The translocation results in the fusion of two transcription factor genes, *MYB* and *GATA1*, leading to the production of a MYB-GATA1 fusion protein. Affected male patients' cells lack normal GATA1. We have shown that the *MYB-GATA1* fusion gene promotes granulocytic over monocytic differentiation and favours hematopoietic cells self-renewal. Belloni *et al.* have shown that low GATA1-expressing mice whose haematopoiesis was reconstituted with MYB-GATA1-expressing cells developed myelodysplasia and leukaemia [3]. However, none of these studies demonstrated a role for MYB-GATA1 in the basophilic differentiation of blasts.

Little is known about the physiological basophilic differentiation. In mice, the ontogeny of basophils is controversial. For Arinobu *et al.*, basophils derive from a common splenic Mast Cell-Basophil Progenitor (MCBP) [4] whereas Huang and Li describe a specific Granulo-Monocytic Progenitor expressing Fc ϵ RI which could be the main source of basophils [5]. “Basophilopoiesis” and the factors regulating it are even less well understood in humans, where a common eosinophil-basophil precursor is postulated to exist [6,7]. Basophil differentiation does not seem to rely on a specific cytokine: even though IL-3 is a potent driver of basophil differentiation *in vitro*, IL-3 knock-out mice do not show a defect in these cells, leading some authors to consider basophil differentiation a default pathway (reviewed in [8]). Specific transcription factors have been implicated in this process. The successive expression of GATA2 and CEBPA is crucial for correct basophil differentiation, but they are thought to act in concert with other transcription factors, including STAT5 and GATA1 [9–11].

GATA1 is a member of the GATA family of zinc finger DNA binding proteins that is involved in the differentiation of several hematopoietic lineages. It contains three domains: two DNA binding zinc fingers (N- and C-finger) and an N-terminal transactivation domain. The C-finger binds to WGATAR DNA sequences, while the N-finger binds to cofactors including FOG1. GATA1 and GATA2 share many binding sites, but despite their close homology they play different roles, GATA2 being typically more active in immature hematopoietic cells (reviewed in [12]).

In hematopoietic cells, GATA1 has also been shown to down-regulate the expression of MYB [13]. Indeed, MYB is mainly expressed in immature cells and its down-regulation is a prerequisite for differentiation. It is composed of a DNA binding domain (DBD), a transactivation domain (TAD) and a C-terminal negative regulation domain (NRD) involved in transcriptional repression. Deletion of the C-terminal NRD increases the transcriptional activity of MYB and is thought to explain the oncogenicity of some MYB fusion proteins [14,15]. MYB is an important actor in haematological malignancies since its suppression impairs the transformation of myeloid cells by other oncogenes [16,17]. However, *MYB* mutations are relatively rare in this context, and are mainly found in acute lymphoblastic leukaemias [18,19].

Given the role of MYB and GATA1 in haematopoiesis and the typical basophilic phenotype of leukaemias expressing the *MYB-GATA1* fusion transcript, we wanted to explore the role of this chimera in pathological basophilic skewing. Since no indication of basophilic differentiation was seen in previous studies in murine cells, we reasoned that this process might be specific to human cells. Here, we show that expression of MYB-GATA1 in human cell lines or primary CD34 positive cells increases basophil differentiation markers and that this increased basophilia is at least partly due to increased expression of the IL-33 receptor IL1RL1 and the NGF receptor NTRK1.

Material and methods

Cell culture and characterization

Recombinant cytokines were obtained from Shenandoah (Warwick, UK). Primary CD34⁺ cells were immunopurified from placental blood obtained after signed informed consent of the mother, grown at 37°C in Stem α A (Stem Alpha, Saint-Genis l'Argentière, France) with 50 ng/mL SCF, FLT3L and TPO. For basophil differentiation, cells were cultured in IMDM containing TGF- β and interleukin 3 (IL-3) as described [20].

For immunophenotypical characterization, cellular suspensions were incubated with: CD34-PE/Cy7, CD33-APC, CD45-eFluor®450, CD123-eFluor®450, CD117-PE/Cy7 (eBiosciences), CD203c-PERCP/Cy5.5, Fc ϵ RI-APC (Biolegend, San Diego, CA) or isotype matched controls and analysed on a FACS CANTO II (Beckton Dickinson).

Plasmids

The coding sequence of *MYB-GATA1* was inserted into the lentiviral p252 plasmid under the control of MND promoter. pLVUT-sh*GATA1* containing shRNA-*GATA1* and GFP was a gift from Dr Wierenga [21].

Mouse Xenograft experiments

Three sets of experiments were conducted, each with 5 to 10 female NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) mice [22] bred under pathogen-free conditions and experiments were performed in the “Service des animaleries” of the University of Bordeaux in conformity with the rules of the Institutional Animal Care and Use committee (Ministerial approval number 00048.2). Busulfan pre-conditioned mice were grafted with 10⁵ CD34⁺ cells transfected with lentivirus (MOI: 50-100).

Quantitative RT-PCR

Total RNAs were extracted by Trizol (Life technologies). cDNAs were synthesized using Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Boulogne-Billancourt, France). Quantitative PCR was performed using qPCR Brilliant III Ultra-Fast Sybr Green (Agilent technologies, Massy, France). Primer sequences are presented in supplementary table S1. Results were normalized by the mean copy number of three control genes (*GUS*, *RPLP0* and *ACTB*).

Transcriptomic analysis

UT-7 cells expressing *MYB-GATA1* (or empty vector controls) were grown in control medium or in medium containing 2.5ng/mL GM-CSF and 100 ng/mL IL-3 for nine days. Total RNA was extracted using RNeasy minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Cyanine-3 (Cy3)-labelled cRNA was prepared using the “Low Input Quick Amp Labelling Kit, one-color” (Agilent Technologies). For each sample, 1.65 µg cRNA was fragmented and hybridized overnight at 65°C onto Human Gene Expression v2 4x44K microarrays (Agilent Technologies). After bioinformatic analyses (supplementary methods[23,24]) raw and normalized data were deposited on the Gene Expression Omnibus (series GSE72913).

Luciferase assays

Regions of approximately 1000 bp located upstream of the transcription start site of *IL1RL1/ST2* and *NTRK1* were cloned into pGL4.10 vector (Promega). 2.10⁴ HEK293T cells were and co-transfected using Superfect (Qiagen) with 50ng of one of the pGL4.10 plasmids, 50 ng of one of the MYB/MYB-GATA1 plasmids and 5 ng of the CMV-*Renilla* luciferase pGL4.75 plasmid (Promega). The firefly and *Renilla* luciferases activities were measured 24h

post-transfection using the DualGlo-Luciferase Reporter Assay System (Promega), and the ratios of the firefly to *Renilla* activities were calculated.

Statistical analysis

All statistical analyses used Prism 5 (GraphPad software Inc.). The statistical significance of differences in mean values was analysed by the two-tailed Mann–Whitney nonparametric test, paired t test. Results were considered to be statistically significant when $p < 0.05$.

More details on the methods are given in supplementary informations

Results

MYB-GATA1 induces basophilic differentiation in NSG mouse transplant models

MYB-GATA1 has previously been shown to increase progenitor self-renewal and skewing towards granulopoiesis. To look for evidence of a basophilic differentiation, we chose to express MYB-GATA1 in human CD34⁺ stem/progenitor cells placed in an environment permissive for multiple differentiation pathways. The human CD34⁺ cells were transduced with two lentiviral vectors, one encoding MYB-GATA1 or control, each with tdTomato marker, the other a short hairpin RNA against *GATA1* or a control irrelevant shRNA, each with GFP marker. Flow cytometry of human cells retrieved from murine femurs twelve weeks after grafting showed the median percentage of engrafted cells determined by human CD45 positivity was respectively 51.7% and 75.7% for control and MYB-GATA1/ShGATA1 expressing cells (ranges: 4-90; 14.6-89.5). Among cells positive for hCD45, some were transduced with the tomato expressing vector (T⁺), others with the GFP expressing vector (G⁺) or with both vectors (G⁺,T⁺) (Figure 1A). The retention of CD34 expression in cells expressing both the *MYB-GATA1* and the *shGATA1* transgenes compared to control cells (G⁺T⁺ gating) was confirmed (Figure 1B). Cells expressing *MYB-GATA1* and *shGATA1* also displayed an increase in myeloid lineage markers (CD33, CD117) confirming previous results indicating granulocytic skewing. More interestingly, the basophil-specific markers CD203c and FcεRI were also clearly more expressed in these cells, demonstrating an increase in basophilic differentiation. In order to tease out the roles of MYB-GATA1 fusion versus GATA1 silencing, cells transduced with the MYB-GATA1 vector alone (T⁺) were analysed for the same markers. There was again a delay in maturation and an increase in myeloid and basophilic differentiation, albeit to a slightly lower extent than with the *MYB-GATA1* and *shGATA1* transgenes together (Figure 1C). These effects were not seen in cells expressing only the *shGATA1* transgene (Figure S1). A batch of seven additional mice per condition were transplanted with total bone marrow harvested from “primary” recipients showing heterogeneous engraftment hampering precise analysis of long

term differentiation. However, none of the secondary mice developed evidence of leukaemia. We conclude that gain of a *MYB-GATA1* fusion gene is more important than loss of GATA1 expression for basophilic differentiation of human CD34+ cells. Hence in the remainder of this study we focused on the impact of MYB-GATA1 alone on basophilic differentiation.

MYB-GATA1 induces basophilic differentiation of UT-7 cells

UT-7 cells can be differentiated into “basophil-like” cells by culture in specific conditions [25]. In particular, in our hands cells grown in IL-3 + GM-CSF express more surface CD203c and FcεRI (p=0.02), confirming their basophilic differentiation. Hence, we tested whether expression of MYB-GATA1 in UT-7 cells could induce basophilic differentiation.

UT-7 cells expressing MYB-GATA1 after lentiviral transduction were compared to control. Cells grown in standard conditions containing EPO or in the presence of IL-3 + GM-CSF (basophilic differentiating conditions). May-Grünwald Giemsa staining showed a gradual increase in the level of vacuolization, from a low level in control undifferentiated cells, to an intermediate level in MYB-GATA1 cells and a high level in cytokine-differentiated cells. More importantly, the proportion of cells stained with Alcian blue, a metachromatic dye specific for basophils, followed the same pattern with 69% of MYB-GATA1 cells positive versus only 19% positive in the control conditions (Figure 2A). Flow cytometry did not show clear evidence of differences in the markers we studied. In contrast, quantitative RT-PCR studies showed significant increases in CD203c (*ENPP3*) (p=0.02), β-tryptase (*TPSAB1*) (p=0.01) and histidine decarboxylase (*HDC*) transcripts (p=0.007). Moreover, Charcot-Leyden-Cristal (*CLC*) protein, and to a lesser extent FcεRI (*FCERIA*), markers previously shown to be increased during basophilic differentiation [26], were more expressed in *MYB-GATA1* transduced cells (Figure 2B).

Transcriptomic studies confirm a role for MYB-GATA1 in basophilic differentiation and identify novel transcriptional targets

Although established cell lines do not perfectly recapitulate basophilic differentiation, they are a more tractable model than primary cells to perform mechanistic studies. In order to identify genes regulated by the putative novel transcription factor encoded by the *MYB-GATA1* fusion gene, we performed transcriptomic analyses of UT-7 cells expressing MYB-GATA1 or not. The transcriptional changes induced by MYB-GATA1 expression were compared to those induced by cytokinetic differentiation. Following multiple testing correction, no gene expression changes had an interaction coefficient significantly different from zero and an absolute log fold change greater than two, indicating the lack of interaction between the two conditions. Nine genes were found to be differentially expressed (Benjamini Hochberg adjusted p-values ≤ 0.1) and up-regulated in both conditions: *IL1RL1*, *NTRK1*, *CCL23*, *RGS9*, *HPGDS*, *CD3D*, *LST1*, *LAT2*, *SLC45A3* (Figure 2C). The increased expression of these nine genes was confirmed by qRT-PCR (figure S1).

MYB-GATA1 induces basophilic differentiation in primary human CD34+ cells

To confirm the relevance of the results in UT-7 cells, basophilic differentiation was studied in primary human CD34+ cells transduced with *MYB-GATA1* or empty vector. As a positive control, basophilic differentiation was induced by combined treatment with IL-3 and TGF- β . Figure 3A (lower panel) shows Alcian blue staining of cells expressing MYB-GATA1; about 50% of the cells have basophilic granules in their cytoplasm. This is significantly more than the 20% with basophilic granules seen in cells expressing control vector (Figure 3A upper panel) but less than the 85% seen in cells cultured with IL-3 + TGF- β (Figure 3B). To confirm the presence of basophilic differentiation, qRT-PCR was performed on classic basophil genes (*TPSAB1*, *FCERIA*, *HDC*, *CLC* and *ENPP3*). MYB-GATA1 increased the expression of these

genes 1.5 to 3.7-fold (Figure 3C). Having confirmed the effect of MYB-GATA1 on basophilic differentiation in human primary cells, we tested whether the nine genes induced in UT-7 cells by MYB-GATA1 expression and by basophilic differentiation were also induced by these treatments in CD34-positive cells. The q-RT-PCR data in Figure 4A show that all were induced in both conditions, albeit to different levels. *IL1RL1* and *NTRK1* stood out as the most relevant deregulated genes, especially in MYB-GATA1 expressing cells. Moreover, flow cytometry using an antibody directed against IL1RL1 showed more cells expressing this protein after MYB-GATA1-transduction (78%) compared to control cells (57.6%), confirming that the increased mRNA level translates into increased receptor expression at the cell surface (p=0.03) (figure 4B). We conclude that the *MYB-GATA1* transgene induces the expression of basophilic marker genes in primary CD34+ cells.

Basophilic differentiation due to MYB-GATA1 is increased by IL-33 and NGF

Since *IL1RL1* and *NTRK1* encode cytokine receptors, we wondered whether signalling from these cytokine receptors might be responsible for the basophilic skewing observed in MYB-GATA1 expressing cells. UT-7 cells can be grown in GM-CSF and require the addition of IL-3 to undergo basophilic differentiation. The addition of IL-33, NGF or both increased the expression of classic basophilic marker genes (Figure 5A). The induction of all except *CLC* was increased by MYB-GATA1, especially for the most specific basophilic markers *ENPP3* (CD203c) and *FCER1A* (FcεRI). We conclude that signalling through NTRK1 and IL1RL1 is increased in MYB-GATA1 expressing cells and this promotes basophilic differentiation.

NGF and IL-33 increase basophilic differentiation of human CD34-positive cells

To confirm the potential role of NGF and IL-33 in basophilic differentiation observed in cell lines expressing MYB-GATA1, we wondered whether these cytokines might induce basophilic

differentiation of normal primary human CD34⁺ cells. Cells were cultured with 5 ng/mL TGF- β or 20 ng/mL IL-3 to which 20 ng/mL NGF or IL-33 were added. Figure 5B shows the proportion of Alcian-blue stained cells. This percentage was significantly increased when IL-33 or NGF was added to TGF- β (70% and 50% respectively) compared to cells cultured in TGF- β alone (10%, $p < 0.05$). This proportion is also slightly increased when IL-33 or NGF was added to IL-3, but the difference did not reach statistical significance. Quantitative RT-PCR performed on classic basophilic marker genes confirmed the differentiating effect of NGF (Figure 5C) which increased the expression of *FCER1A* (Fc ϵ RI), *ENPP3* (CD203c) and *TPSAB1* (β -tryptase).

MYB-GATA1 activates the IL1RL1 and NTRK1 promoters

To further explore the mechanism of regulation of IL1RL1 and NTRK1 by MYB-GATA1, the promoter regions of both genes were cloned upstream of a luciferase reporter gene. The reporters were co-transfected into HEK 293T cells with wild type *MYB*, *MYB-GATA1* or a control vector. The promoter activity of IL1RL1 was increased 8.5-fold by MYB-GATA1 ($p = 0.007$) and 11.2-fold by MYB ($p = 0.02$) (Figure 6A left panel). The promoter activity of NTRK1 was increased 2.2-fold by MYB-GATA1 ($p = 0.009$) and 5-fold by MYB ($p = 0.03$) (Figure 6A right panel). This shows that MYB-GATA1 can stimulate IL1RL1 and NTRK1 promoter activity, but the fact that wild type MYB has the same effect argues against the oncogenic activity of the fusion protein being caused by a change in its sequence-specific DNA binding activity. We then asked whether the stronger activation of IL1RL1 and NTRK1 in cells expressing MYB-GATA1 could be due to an increase in the stability of the fusion protein compared to that of wild type MYB. After transduction of both constructs, cells were treated with cycloheximide for 4, 8 or 24 hours and MYB or MYB-GATA1 protein levels were assessed by western blot. As shown in figure 6B, MYB-GATA1 was very stable even after 24

hours cycloheximide treatment, whereas wild type MYB had nearly totally disappeared in 4 hours. We conclude that the lower transcriptional activity of the MYB-GATA1 protein in short term luciferase assays could be offset by a much greater stability of the fusion protein in leukemic cells, leading to higher induction of endogenous target genes in leukaemia.

Discussion

Acute basophilic leukaemias (ABL) are rare haematological disorders, occurring *de novo* or as blastic transformation of chronic myelogenous leukaemia. No specific chromosomal or genetic abnormality had been linked to this pathology before we described the t(X;6)(p11;q23) translocation. This specific abnormality is even rarer than ABL itself since only a few cases have been described, but understanding its pathogenesis may provide information on pathways more commonly deregulated in ABL as well as in other haematological malignancies with basophil hyperplasia and in physiological basophilopoiesis. The t(X;6)(p11;q23) translocation leads to the production of a *MYB-GATA1* fusion gene and the disappearance of the *GATA1* gene [2,3]. Since *GATA1* is located on the X chromosome, the translocation eliminates *GATA1* expression in affected cells of male patients. However, the link between the chromosomal abnormality and the phenotype was not previously clearly established. Even in AML with a “lineage specific” abnormality, evidence of a specific phenotype by lineage skewing may be difficult to demonstrate experimentally. For example, knock-in of the *RBM15-MKL1* fusion gene, which defines a specific megakaryoblastic leukaemia, induces only modest megakaryocytic colony growth [27]. Due to the physiologically weak representation of the basophil lineage, basophilic skewing is even more difficult to demonstrate. We chose to use human progenitor cells and provided them with a microenvironment allowing for long term development by transplantation into NSG mice. In these conditions, the analysis of human cells (expressing hCD45) showed increased retention of immature, CD34⁺ cells when both *MYB-GATA1* and sh*GATA1* were expressed. This is consistent with previous results indicating increased self-renewal of murine CD34⁺ cells [2,3]. Similarly, myeloid markers, including CD33 were more expressed in these cells, again consistent with the skewing towards the granulocytic lineage previously described. Of more relevance to our question, increased expression of FcεRI and CD203c demonstrate that cells expressing the *MYB-GATA1* and

sh*GATA1* transgenes are also skewed towards the basophilic lineage. While it can be argued that FcεRI does not uniquely identify basophils (it is expressed by other lineages, in particular, mast cells and eosinophils), CD203c seems to be quite specific for basophils [28]. We did not observe a fully leukemic phenotype in any of the transplanted mice, indicating that MYB-GATA1 and decreased GATA1 expression are probably not sufficient to induce a basophilic leukaemia, but require additional cooperating genetic events, possibly in proliferation genes. This is probably what happened in the mice reported by Belloni and co-workers to develop myelodysplastic syndromes or leukaemias after a long latency [3]. Since the *MYB-GATA1* vector expressed tdTomato, while the sh-*GATA1* vector transfected cells expressed GFP, we were able to analyse, in the same experiments, cells expressing both transgenes or either one alone. Increased self-renewal, granulocytic skewing and basophilic skewing were clearly present in cells expressing MYB-GATA1 alone. This led us to hypothesize that although MYB-GATA1 expression and GATA1 down-regulation are likely to cooperate in determining the basophilic leukaemia phenotype, MYB-GATA1 has the main effect. Indeed, cells expressing the sh*GATA1* transgene alone did not show any of these characteristics. For this reason, we decided to explore the mechanisms by which this fusion protein could direct basophilic differentiation. CD34 positive cells are difficult to obtain in large quantities, difficult to transduce with large DNA inserts (as is the case for *MYB-GATA1*) even with lentiviruses, leading to low transduction efficiencies, thus necessitating cell sorting for mRNA analyses. For these reasons, we decided to model MYB-GATA1 basophilic skewing in hematopoietic cell lines. Some cell lines, such as UT-7 have previously been shown to be capable of differentiating towards the basophilic lineage in appropriate culture conditions. We validated the fact that MYB-GATA1 expression also skewed these cells towards the basophilic lineage. This skewing is not as efficient as by cytokine stimulation with IL-3 and GM-CSF, but still increases Alcian blue staining and the expression of a panel of mRNAs typically increased during basophilic

differentiation [26]. These results not only reinforce the idea that MYB-GATA1 favours basophilic engagement, they also provided us with a tool to perform transcriptomic studies for genes deregulated by both MYB-GATA1-induced and cytokine-induced basophilic differentiation. Nine genes showed increased expression in both conditions. We reasoned that these genes could be important mediators of MYB-GATA1-induced basophilic differentiation. The relevance of these genes was confirmed by qRT-PCR in UT-7 and primary CD34+ cells. Three of the genes seem particularly interesting because they are implicated in cytokine/chemokine signalling: *CCL23*, the IL-33 receptor *IL1RL1*, and the NGF receptor *NTRK1*. To our knowledge, no relation between *CCL23* and basophils has yet been demonstrated. It is noteworthy however that *CCL23* mRNA is overexpressed in leukemic blasts as compared to normal bone marrow cells and has been proposed as a minimal residual disease marker [29]. IL-33 clearly plays a role in basophil biology and both cytokine and receptor have been implicated in the pathogenesis of allergy [30,31]. It is also a driver of mast-cell maturation [32], which may share characteristics with basophilopoiesis. Interestingly, the *IL1RL1* promoter contains binding sites for GATA1 or GATA2 [33] and could be deregulated by binding of the MYB-GATA1 chimera, but MYB binding sites have also been clearly identified. Similarly, NGF is known for its priming functions in mature basophils [34], but the involvement of neither IL-33 nor NGF receptors in basophilic differentiation has been described thus far. We have shown that MYB-GATA1 activates *IL1RL1* and *NTRK1* transcription in luciferase assays with vectors containing only the promoter proximal 1 kb regions of these genes upstream of a luciferase gene. While this does not completely prove that the activation is direct, it does allow us to rule out post-transcriptional mechanisms. Wild type MYB also shows potent transcriptional activation of these genes, suggesting that the chimera targets MYB binding sites in the promoters of the target genes. However, since wild type MYB is readily degraded whereas MYB-GATA1 is extremely stable, as shown by inhibition of protein degradation with

cycloheximide, the net effect on IL1RL1 or NTRK1 expression is much greater in leukemic cells expressing MYB-GATA1 than in normal cells expressing wild type MYB.

Finally, our results show that MYB-GATA1 promotes basophilic differentiation by sensitising cells to NGF and IL-33. The effect in normal primary cells is rather modest for IL-33, which suggests that this cytokine is more efficient on malignant cells than normal cells. This is consistent with a recent report highlighting the role of this cytokine in malignant haematopoiesis [35]. Taken together, our results have demonstrated a role for MYB-GATA1 in basophilic differentiation, part of which can be attributed to upregulation of the receptors for IL-33 and NGF. These cytokines also promote basophilic differentiation in normal cells, but seem to be more efficient in the context of malignant haematopoiesis.

Acknowledgements:

This work was supported by a grant of Association Laurette Fugain and association Parentraides. SD receives a fellowship from the CHU de Bordeaux and SIRIC BRIO.

Authors are grateful to Pr R. Iggo for excellent advice and critical reading of the manuscript and to Dr K. Druey, MSTs, LAD, NIAID, NIH for providing essential vectors. We thank the staff from the A2 animal house and the vector core facility of the University of Bordeaux for their kind help and their technical support. The authors also thank the Maison de Santé Protestante de Bagatelle (Talence, France) for providing umbilical cord blood.

Authorship Contributions

SD, VPM, MCD and PBLG performed experiments; BC and HS performed microarray analyses; CQ and PB provided vector constructs; JMP, FMG, MA, FXM and EL designed the research and analysed the data. SD, VPM and EL wrote the manuscript. All authors reviewed and approved the manuscript.

References

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; **127**: 2391–405.
2. Quelen C, Lippert E, Struski S, et al. Identification of a transforming MYB-GATA1 fusion gene in acute basophilic leukemia: a new entity in male infants. *Blood* 2011; **117**: 5719–22.
3. Belloni E, Shing D, Tapinassi C, et al. In vivo expression of an aberrant MYB-GATA1 fusion induces leukemia in the presence of GATA1 reduced levels. *Leukemia* 2011 J; **25**: 733–6.
4. Arinobu Y, Iwasaki H, Gurish MF, et al. Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 18105–10.
5. Huang H, Li Y. Mechanisms controlling mast cell and basophil lineage decisions. *Curr Allergy Asthma Rep* 2014; **14**: 457.
6. Leary AG, Ogawa M. Identification of pure and mixed basophil colonies in culture of human peripheral blood and marrow cells. *Blood* 1984; **64**: 78–83.
7. Denburg JA, Telizyn S, Messner H, et al. Heterogeneity of human peripheral blood eosinophil-type colonies: evidence for a common basophil-eosinophil progenitor. *Blood* 1985; **66**: 312–8.
8. Schneider E, Thieblemont N, De Moraes ML, et al. Basophils: new players in the cytokine network. *Eur Cytokine Netw* 2010; **21**: 142–53.
9. Iwasaki H, Mizuno S, Arinobu Y, et al. The order of expression of transcription factors directs hierarchical specification of hematopoietic lineages. *Genes Dev* 2006; **20**: 3010–21.
10. Li Y, Qi X, Liu B, Huang H. The STAT5-GATA2 Pathway Is Critical in Basophil and Mast Cell Differentiation and Maintenance. *J Immunol* 2015; **194**: 4328–38.
11. Nei Y, Obata-Ninomiya K, Tsutsui H, et al. GATA1 regulates the generation and function of basophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; **110**: 18620–5.
12. Bresnick EH, Lee H-Y, Fujiwara T, et al. GATA switches as developmental drivers. *J Biol Chem* 2010; **285**: 31087–93.
13. Bartůnek P, Králová J, Blendinger G, et al. GATA1 and c-myb crosstalk during red blood cell differentiation through GATA1 binding sites in the c-myb promoter. *Oncogene* 2003; **22**: 1927–35.
14. Dash AB, Orrico FC, Ness SA. The EVES motif mediates both intermolecular and intramolecular regulation of c-Myb. *Genes Dev* 1996; **10**: 1858–69.

15. Persson M, Andrén Y, Mark J, et al. Recurrent fusion of MYB and NFIB transcription factor genes in carcinomas of the breast and head and neck. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**: 18740–4.
16. Anfossi G, Gewirtz AM, Calabretta B. An oligomer complementary to c-myb-encoded mRNA inhibits proliferation of human myeloid leukemia cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**: 3379–83.
17. Lidonnici MR, Corradini F, Waldron T, et al. Requirement of c-Myb for p210(BCR/ABL)-dependent transformation of hematopoietic progenitors and leukemogenesis. *Blood* 2008; **111**: 4771–9.
18. Clappier E, Cucchini W, Kalota A, et al. The C-MYB locus is involved in chromosomal translocation and genomic duplications in human T-cell acute leukemia (T-ALL), the translocation defining a new T-ALL subtype in very young children. *Blood* 2007; **110**: 1251–61.
19. Lahortiga I, De Keersmaecker K, Van Vlierberghe P, et al. Duplication of the MYB oncogene in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 2007; **39**: 593–5.
20. Sillaber C, Geissler K, Scherrer R, et al. Type beta transforming growth factors promote interleukin-3 (IL-3)-dependent differentiation of human basophils but inhibit IL-3-dependent differentiation of human eosinophils. *Blood* 1992; **80**: 634–41.
21. Wierenga ATJ, Vellenga E, Schuringa JJ. Down-regulation of GATA1 uncouples STAT5-induced erythroid differentiation from stem/progenitor cell proliferation. *Blood* 2010; **115**: 4367–76.
22. Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, et al. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol* 2005; **174**: 6477–89.
23. Smyth GK, Michaud J, Scott HS. Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* 2005; **21**: 2067–75.
24. Leek JT, Storey JD. Capturing heterogeneity in gene expression studies by surrogate variable analysis. *PLoS Genet* 2007; **3**: 1724–35.
25. Hermine O, Mayeux P, Titeux M, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and erythropoietin act competitively to induce two different programs of differentiation in the human pluripotent cell line UT-7. *Blood* 1992; **80**: 3060–9.
26. Grundström J, Reimer JM, Magnusson SE, et al. Human cord blood derived immature basophils show dual characteristics, expressing both basophil and eosinophil associated proteins. *PloS One* 2012; **7**: e48308.
27. Mercher T, Raffel GD, Moore SA, et al. The OTT-MAL fusion oncogene activates RBPJ-mediated transcription and induces acute megakaryoblastic leukemia in a knockin mouse model. *J Clin Invest* 2009; **119**: 852–64.

28. Bühring HJ, Simmons PJ, Pudney M, et al. The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors. *Blood* 1999; **94**: 2343–56.
29. Steinbach D, Schramm A, Eggert A, et al. Identification of a set of seven genes for the monitoring of minimal residual disease in pediatric acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2006; **12**: 2434–41.
30. Saluja R, Ketelaar ME, Hawro T, et al. The role of the IL-33/IL-1RL1 axis in mast cell and basophil activation in allergic disorders. *Mol Immunol* 2015; **63**: 80–5.
31. Pecaric-Petkovic T, Didichenko SA, Kaempfer S, et al. Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. *Blood* 2009; **113**: 1526–34.
32. Allakhverdi Z, Smith DE, Comeau MR, et al. Cutting edge: The ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells. *J Immunol* 2007; **179**: 2051–4.
33. Baba Y, Maeda K, Yashiro T, et al. GATA2 is a critical transactivator for the human IL1RL1/ST2 promoter in mast cells/basophils: opposing roles for GATA2 and GATA1 in human IL1RL1/ST2 gene expression. *J Biol Chem* 2012; **287**: 32689–96.
34. Bürgi B, Otten UH, Ochensberger B, et al. Basophil priming by neurotrophic factors. Activation through the trk receptor. *J Immunol* 1996; **157**: 5582–8.
35. Mager LF, Riether C, Schürch CM, et al. IL-33 signaling contributes to the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *J Clin Invest* 2015; **125**: 2579–91.

Legend to figures:

Figure 1: Immunophenotypical analysis of MYB-GATA1 expressing human CD34-positive cells after transplantation in NSG mice.

Human CD34⁺ hematopoietic progenitor cells were transduced with a lentivirus allowing the expression of MYB-GATA1 or with a control vector, both vectors expressing also TdTomato. Cells were also transduced with a lentivirus allowing the expression of a sh-RNA against *GATA1* or of a sh-RNA against an irrelevant luciferase as a control, both vectors encoding GFP. Twelve weeks after xenografting 10⁵ cells per mice, expression of markers of immaturity (CD34⁺), of myeloid differentiation (CD33⁺, CD117⁺) and of basophilic differentiation (CD203c, FcεRI) were studied by flow cytometry. Panel **A** resumes the gating strategy. Panel **B** compares these markers in cells transduced with *MYB-GATA1* and *shGATA1* versus controls. Panel **C** reports the values of cells transduced only with *MYB-GATA1* (or control), but not *sh-GATA1*. Data from 33 mice during 3 experiments were analysed.

Figure 2: MYB-GATA1 induced basophilic differentiation of UT-7 cells.

(A) Basophilic differentiation was evaluated by Alcian Blue staining after transduction of UT-7 cells with a vector encoding the fusion protein MYB-GATA1 or with a control empty vector. (B) Gene expression of "basophilic markers" (*TPSABI*, *FCERIA*, *HDC*, *CLC* and *ENPP3*) was evaluated by qRT-PCR on UT-7 cells transduced by *MYB-GATA1* or by an empty vector. The expression of these genes was normalized by three reference genes (*GUS*, *RPLPO* and *ACTB*). Results are presented as average fold-increase due to MYB-GATA1 expression (Six experiments). The expression of MYB-GATA1 increases 1.3 times the expression of *FCERIA* (p=0.3), 1.8 times the expression of *HDC* (p =0.002), 2.3 times the expression of *ENPP3* (CD203c) (p=0.06), 2.8 times the expression of *TPSABI* (β-tryptase) (p = 0.05) and 5.3 times the expression of *CLC* (p=0.1).

(C) Transcriptomic analysis: UT-7 cells expressing MYB-GATA1 or control vector were sorted according to TdTomato positivity, grown in non-differentiating conditions or differentiated by GM-CSF + IL-3. Transcriptomic analysis was performed with Human Gene Expression v2 4x44K microarrays. Graphics represent the variation of expression of nine genes (*CCL23*, *CD3D*, *HGPDS*, *IL1RL1*, *LAT2*, *LST1*, *NTRK1*, *RGS9* and *SLC45A3*) in non-differentiating (triangles) or differentiating (circles) conditions with MYB-GATA1 or control vectors. Two experiments were analysed. The variation of expression is expressed in log intensity.

Figure 3: MYB-GATA1 induced basophilic differentiation in primary human CD34-positive cells.

CD34⁺ cells expressing MYB-GATA1 were grown in non-differentiating conditions, or differentiated by 20 ng/mL IL-3 + 5 ng/mL TGF- β . **Panel A** shows an example of Alcian blue staining of CD34-positive cells expressing control vector (top) or MYB-GATA1 (bottom), (x60) Nikon Eclipse 80i Microscope. **Panel B** compares the percentage of Alcian blue positive cells in each condition and in a differentiation control. **Panel C** represents the expression of "basophilic marker" genes (*TPSAB1*, *FCERIA*, *HDC*, *CLC* and *ENPP3*) evaluated by qRT-PCR on CD34⁺ cells transduced by *MYB-GATA1* or empty vector and cultured in non-differentiating conditions for 9 days. The expression of these genes was normalized by the reference genes (*GUS*, *RPLPO* and *ACTB*). MYB-GATA1 increases 1.5 times the expression of *TPSAB1*, 1.7 times the expression of *CLC*, 2.3 times the expression of *FCERIA*, 2.5 times the expression of *HDC* and 3.7 times the expression of *ENPP3*. These results were obtained by two independent experiments.

Figure 4: Validation of transcriptomic data by qRT-PCR

(A) The nine gene transcripts that were differentially expressed in UT-7 cells in the presence of MYB-GATA1 were tested by qRT-PCR in CD34+ cells transduced with *MYB-GATA1* and compared with their expression in control cells. By comparison, the effect of the differentiating cytokines (IL-3 + TGF- β) on CD34+ cells transduced with control vector is shown in (B). These results were obtained by two independent experiments.

(C) UT-7 cells were transduced with *MYB-GATA1* or a control empty vector, both expressing TdTomato. Transduced cells were stained with or without (control) 10 μ g/mL mouse monoclonal antibody against ST2 and with Alexa 633 conjugated goat anti-mouse IgG1. Cells were gated based upon their TdTomato signal. Results are representative of seven independent measurements.

Figure 5: Effect of IL-33 and NGF on basophilic differentiation in MYB-GATA1 transduced UT-7 cells and in primary human CD34-positive cells

(A) UT-7 cells expressing MYB-GATA1 or a control vector were cultured with GM-CSF to which were added NGF (50 ng/mL) or/and IL-33 (50 ng/mL). mRNA levels of basophil markers (*TPSAB1*, *HDC*, *CLC* and *ENPP3* and *FCERIA*) were assessed by qRT-PCR. The expression of these genes was normalized by the reference genes (*GUS*, *RPLPO* and *ACTB*). These results were obtained in three independent experiments.

CD34+ cells were grown for 9 days with 20 ng/mL IL-3, 5 ng/mL TGF- β or both to which were added NGF (20 ng/mL) or IL-33 (20 ng/mL). (B) compares the percentage of Alcian blue positive cells in each condition. (C) represents the expression of "basophilic marker" genes (*TPSAB1*, *FCERIA*, *HDC*, *CLC* and *ENPP3*) evaluated by qRT-PCR. The expression of these genes was normalized by the reference genes (*GUS*, *RPLPO* and *ACTB*) and rationalized by expression of these genes in presence of TGF alone or IL-3 alone (n=2 independent experiments).

Figure 6: MYB-GATA1 increased IL1RL1 and NTRK1 promoter activity in HEK293T cells

(A): The effects of MYB and MYB-GATA1 expression on the activities of the IL1RL1 (left) and NTRK1 (right) promoters were assessed in co-transfected cells. The normalized luminescence ratios measured in empty plasmid-transfected cells (Control) were arbitrarily set to 1. Data represent the means \pm S.D. of five independent experiments. **(B):** (n= 2 independent experiments). After transduction with 3Xflag-tagged-MYB-GATA1 or MYB lentivirus, cells were cultured in the presence of cycloheximide (100 μ g/ml) and lysed at 0, 4, 8, and 24 h. Cell lysates were separated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and subjected to immunoblot analysis using anti FLAG-antibody. Anti actin was used as loading control.

Supporting informations have been added for online publication. They correspond to supplementary methods and supplementary figures which bring further information about the results presented in the manuscript. The following supplementary material may be found in the online version of this article :

- **Supplementary methods**
- **Supplementary Figures :**
 - **Figure S1: Immunophenotypical analysis of shGATA1 expressing human CD34-positive cells after transplantation in NSG mice**
 - **Figure S2: MYB-GATA1 enhanced expression of the nine genes deregulated in transcriptomic analyses**

Supplement to: S.Ducassou, V.Prouzet-Mauléon, MC.Deau, P.Brunet de la Grange, B.Cardinaud, H.Soueidan *et al.* *MYB-GATA1* fusion promotes basophilic leukemia: involvement of IL-33 and nerve growth factor receptors

1- Supplementary methods:

1) Cell culture

Cord blood cells were obtained from normal full-term deliveries after signed informed consent. CD34⁺ cells were isolated by immunomagnetic positive selection using EasySep™ (Stemcell Technologies, Grenoble, France) according to the manufacturer's instructions and stored in Fetal Cal Serum (FCS) with 10% DMSO under liquid nitrogen. Only batches with a purity >90% as assessed by flow cytometry using CD34-PE (eBiosciences, Paris, France), were used for subsequent experiments. Viral transductions were conducted with viral MOIs of 40 overnight. After 12 hours, the cells were washed and grown in suitable conditions.

UT-7 cells were grown in IMDM containing 50 µM β-mercaptoethanol, 10mM Hepes, 10% fetal calf serum, 2mM L-Glutamine, 100 U/mL penicillin- streptomycin and the appropriate growth factors in a fully humidified atmosphere with 5% CO₂. For maintenance and amplification, cells were grown with 1 U/mL EPO whereas 100 ng/mL IL-3 and 2.5 ng/mL GM-CSF were used for basophilic differentiation. Viral transductions were conducted with viral MOIs of 10.

For cytological studies, cells were cytopinned onto glass slides and analyzed for metachromatic staining of granules by incubating slides in 1% Alcian blue 8 GX (Sigma Aldrich, Lyon, France), diluted in 60% ethanol and 3.7% hydrochloric acid for 15 min. After

staining, slides were rinsed for 2 seconds in water and air-dried. Alternatively, slides were stained by May-Grünwald-Giemsa (Oxoid, Dardilly, France).

2) Plasmids

The coding sequence of *MYB-GATA1* was excised by *SpeI/XbaI* from pMIE-MG and inserted into the lentiviral p252 plasmid (pRRLsin-MND-MCS-PGK-Tomato-WPRE) at *NheI* site.

The control plasmid for *MYB-GATA1* corresponded to the empty lentiviral p252 plasmid. The control for shRNA-*GATA1*, was the same plasmid in which the shRNA-*GATA1* was replaced by a shRNA-luciferase. For quantification of gene expression by RT-qPCR, all the target sequences were cloned into PCR2.1-TOPO vector (Life technologies, Saint Aubin, France).

3) Mouse Xenograft experiment

Mice were bred under specific pathogen-free conditions and experiments were performed in the “Service des animaleries” of the University of Bordeaux in conformity with the rules of the Institutional Animal Care and Use committee (Ministerial approval number 00048.2). Female mice, aged between 6 and 8 weeks, were pre-conditioned 48h and 24h before engraftment with intra-peritoneal injection of 20 mg/kg of busulfan. CD34⁺ cells were thawed and cultured in Stemline II medium (Sigma-Aldrich, Lyon, France) supplemented with 50 ng/mL recombinant human SCF, FLT3L, TPO and 60 ng/mL IL-3 during 24h. Two viral transductions were conducted at 24h and 36h, with viral MOIs between 50 and 100 and addition of 8 µg/mL polybrene. 10⁵ cells were injected into the retro orbital sinus of mice anesthetized with 2.5% isoflurane gas. After 12 weeks, mice were euthanized by cervical dislocation and bone marrow (BM) cells from femurs were flushed with 1 mL IMDM + 1% FCS.

4) Quantitative RT-PCR

Quantitative PCR was performed on a CFX96 real-Time System analyser (Biorad) using qPCR Brilliant III Ultra-Fast Sybr Green (Agilent technologies, Massy, France). The program of qPCR was as follows: 95°C during ten minutes followed by 40 cycles of 95°C during 30 seconds and 60°C during 60 seconds. Results were expressed as copy numbers of genes, determined by comparison to a plasmid standard curve and normalized by the mean copy number of three control genes (*GUS*, *RPLP0* and *ACTB*).

Table S1: Primers used for quantitative RT-PCR

| Targets | Primer names | Sequence |
|-----------------|--------------|-----------------------------------|
| MYB-GATA1 | Forward | TGCTCCTAATGTCAACCGAGA |
| | Reverse | GGCAGTTGGTGCCTGAGTA |
| TSABP1 | Forward | CCCACTGGGTAGAAGGAACA |
| | Reverse | GTGGACTCTCAGGCTCACCT |
| FCER1A | Forward | TGTTCTTCGCTCCAGATGGC |
| | Reverse | GCTGCCATTGTGGAACCATT |
| ENPP3 | Forward | TGTGGATCAACAGTGGCTGG |
| | Reverse | TTTGGTGCTGGTTGAATGCG |
| CLC | Forward | AACAATGTCCCTGCTACCCG |
| | Reverse | CGACGACCAAAGCACACTTG |
| HDC | Forward | TTCGTGATTCGGTCCTTCGG |
| | Reverse | CGAAAACCACCAGGCCAAG |
| GUS | Forward | GTTTCACCAGGATCCACCTC |
| | Reverse | CTCGTCGGTGACTGTTTCAGT |
| ACTIN | Forward | AGCATCGGGTGATGTTTCATT |
| | Reverse | ATTACAAGCATGCGTCACCA |
| RPLPO | Forward | TGGAGGGTGTCCGCAATGTT |
| | Reverse | GAAGGCCTTGACCTTTTCAG |
| IL1RL1 | Forward | AGAGAGGCTGGCTGTTGTATTT |
| | Reverse | AGCCTATATCTCAACCTCATTGGG |
| CD3D | Forward | ACTCTGCTCCTTGCTTTGGG |
| | Reverse | TTCACTTGTTCCGAGCCCAG |
| NTRK1 | Forward | TCTCGCCGGTGGACACTAAC |
| | Reverse | TCTCGATGATGTGGCCTTGG |
| RGS9 | Forward | GCCAGGAGAAGGCATACTGG |
| | Reverse | AGCAACGACTGTTTGTTTCTGGT |
| CCL23 | Forward | GATGACCCTTTCTCATGCTGC |
| | Reverse | GGTGAGGAAGATGACACCCG |
| HPGDS | Forward | CCCATTTTGGAAGTTGATGGA |
| | Reverse | AGGCGCATTATACGTGAGCA |
| SLC45A3 | Forward | CTGGAGATTTAAAAGCCGCCG |
| | Reverse | CGCCAACCTGCCTAGGAATCA |
| LAT2 | Forward | TGCAACAGTTCTTGAAACCC |
| | Reverse | GGTCCTCACGCAGACTTCTC |
| LST1 | Forward | ACCAGCCCCTGATCATTTTCG |
| | Reverse | CTGGGACCAGGACAGAAGGT |
| IL1RL1 promoter | Forward | GGGGTACCCACGAGAGAGAGGTTAGAGAATTTG |
| | Reverse | CCGCTCGAGACTTTCTGCCACAGTTTCACAAC |
| NTRK1 promoter | Forward | GGGGTACCCACGATTCGAGGCCTTAGG |
| | Reverse | GGGGTACCGTGCGCGGTGTAGTGCAG |

5) Transcriptomic analysis

Pre-processed Agilent arrays were analyzed for differential expression using the limma R package. Eight Agilent arrays were obtained for the combination of the following conditions: transfected with mock vector or transfected with full vector (hereafter ‘transfection effect’); absence or presence of differentiating cytokines (hereafter ‘differentiation effect’), each with two replicates.

Single-color raw images were first processed using the Agilent Feature Extraction software version 11, following manufacturer’s instructions.

Samples were corrected for background signal using a normal+exponential convolution model as implemented in the limma method ‘normexp’, without any offset intensity added. Arrays were then quantile normalized using the “normalizeBetweenArrays” method so that all eight arrays have similar distributions of intensities. We then determined the 95th centile of the negative control probes on each array and only kept probes that were at least 10% brighter than this centile on at least two samples. Control probes were then discarded from the analysis. Intensities were averaged (on each array) at the gene level, resulting in 17921 gene measurements in 8 arrays. Raw and normalized data were deposited on the Gene Expression Omnibus (series GSE72913). Visual inspection of the multi-dimensional scaling projection of the arrays indicated the presence of a batch effect corresponding to the two different dates at which replicates were prepared. This batch effect was not confounded with either the differentiation or the transfection effect. Since the batch co-variate was clearly identified, we decided to adjust for it using linear models as described in the surrogate variable analysis methodology. Differential expression of each gene was then assessed using a nested linear model accounting for the nested interaction of the differentiation effect within the transfection effect. We fitted this linear model to the intensities and then called for differential expression

of three contrasts of interest: 1) transgene-expressing vector vs empty vector, 2) presence or absence of differentiating cytokines and 3) interaction between the two effects.

6) Luciferase assay

For reporter analysis, 20.000 HEK293T cells were seeded in 96-well white plates (Dutscher) and co-transfected using the Superfect reagent (Qiagen) with 50ng of one of the pGL4.10 plasmid, 50 ng of one of the p197 plasmid and 5 ng of the CMV-*Renilla* luciferase pGL4.75 plasmid (Promega), that was added in order to assess and take into account the transfection efficiencies.

7) Flow cytometry

UT-7 cells (1×10^5 cells), transduced with control vector or *MYB-GATA1* vector carrying dTomato reporter, were incubated with 10 $\mu\text{g/ml}$ anti-ST2 antibody (MAB523, R&D Systems, Minneapolis, MN) or nothing at 4°C for 30 min in 100 μl in IMDM containing 50 μM β -mercaptoethanol, 10mM HEPES, 10% fetal calf serum, 2mM L-Glutamine, 100 U/mL penicillin-streptomycin. The cells were washed in PBS+EDTA, and stained with Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 633 conjugate (A-21050, Invitrogen, at 2 mg/mL concentration) at 4 °C for 30 min. The stained cells were washed and analyzed by the imaging flow cytometer Canto II (BD Bioscience). The transduced cells flow cytometry experiments are shown in the figures. All experiments were repeated 7 times with identical results.

8) Blocking of protein synthesis in HEK 293 cells

Transiently transfected HEK293 with *MYB* or *MYB-GATA1* plasmid cells were seeded in 12-well plates in medium. 500 000 cells were placed in each well and were treated with 100 $\mu\text{g/mL}$ cycloheximide (Sigma–Aldrich, Germany) to block protein synthesis. Cells were harvested 4h,

8h and 24 h after treatment with cycloheximide. Cell lysates were prepared after each time points of cycloheximide treatment and analyzed by western blotting with anti-Flag antibody (F 1804, Sigma Aldrich, Lyon, France).

2- Supplementary Figures

Figure S1 : Immunophenotypical analysis of shGATA1 expressing human CD34-positive cells after transplantation in NSG mice

Human CD34⁺ hematopoietic progenitor cells were transduced with a lentivirus a lentivirus allowing the expression of a sh-RNA against *GATA1* or of a sh-RNA against an irrelevant luciferase as a control, both vectors encoding GFP. Twelve weeks after xenografting 10⁵ cells per mice, expression of markers of immaturity (CD34⁺), of myeloid differentiation (CD33⁺, CD117⁺) and of basophilic differentiation (CD203c, FcεRI) were studied by flow cytometry. This panel compares these markers in cells transduced with sh*GATA1* *versus* cells transduced with sh-RNA luciferase by gating on the GFP positive human cells. There was no difference in the expression of the different markers between sh*GATA1* and control cells.

Figure S2 : MYB-GATA1 enhanced expression of the nine genes deregulated in transcriptomic analyses

The nine gene transcripts that were differentially expressed in UT-7 cells in the presence of MYB-GATA1 were tested by qRT-PCR and compared with their expression in control UT-7 cells cultured for 7 days in differentiating condition with GM-CSF and IL-3. The expression of these genes measured in duplicates from two experiments was normalized by three reference genes (*GUS*, *RPLPO* and *ACTB*).

Figure 1

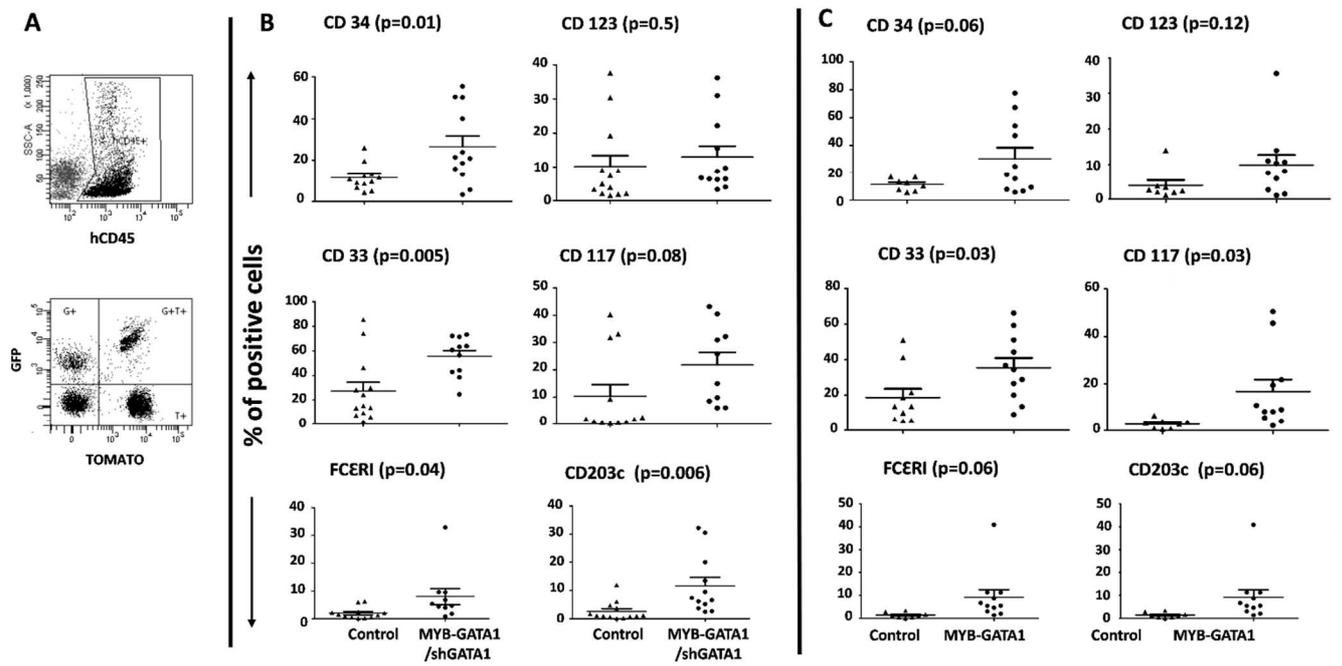


Figure 2

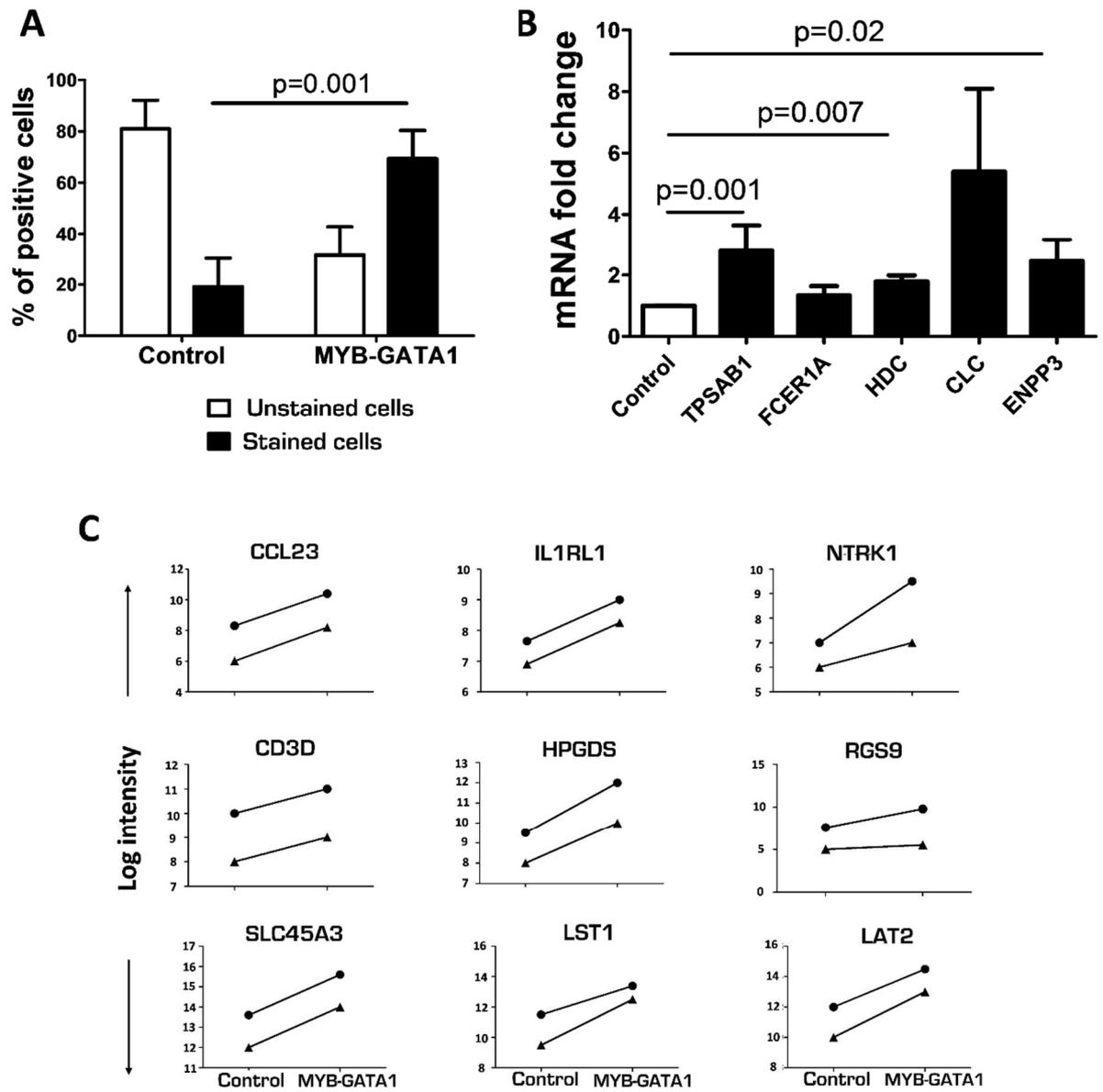


Figure 3

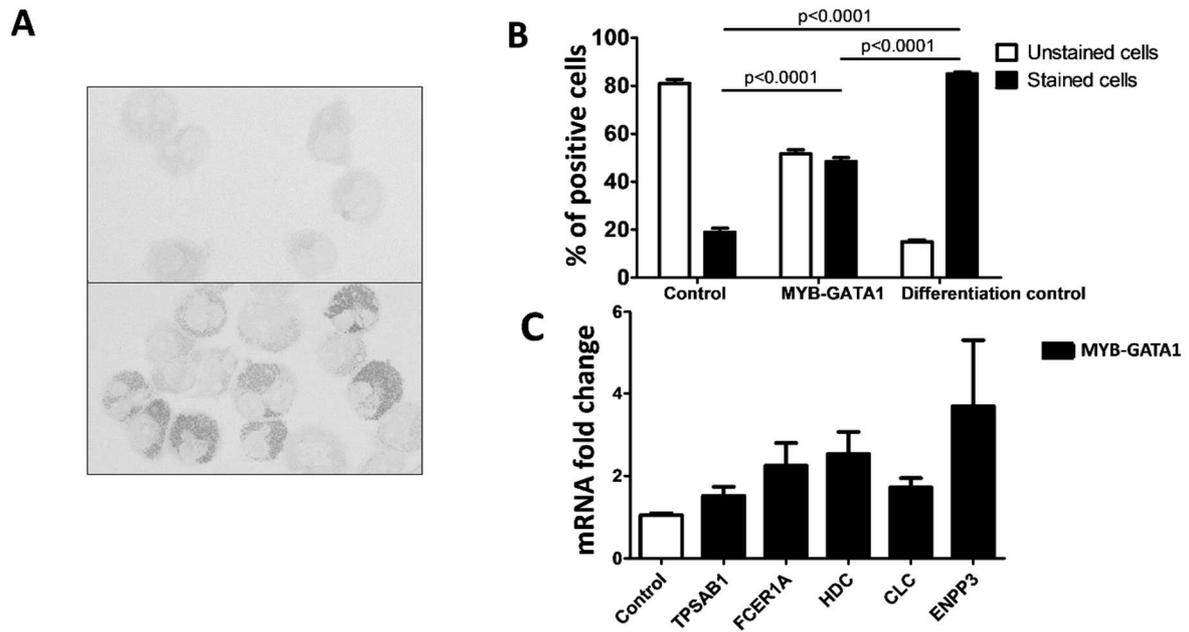


Figure 4

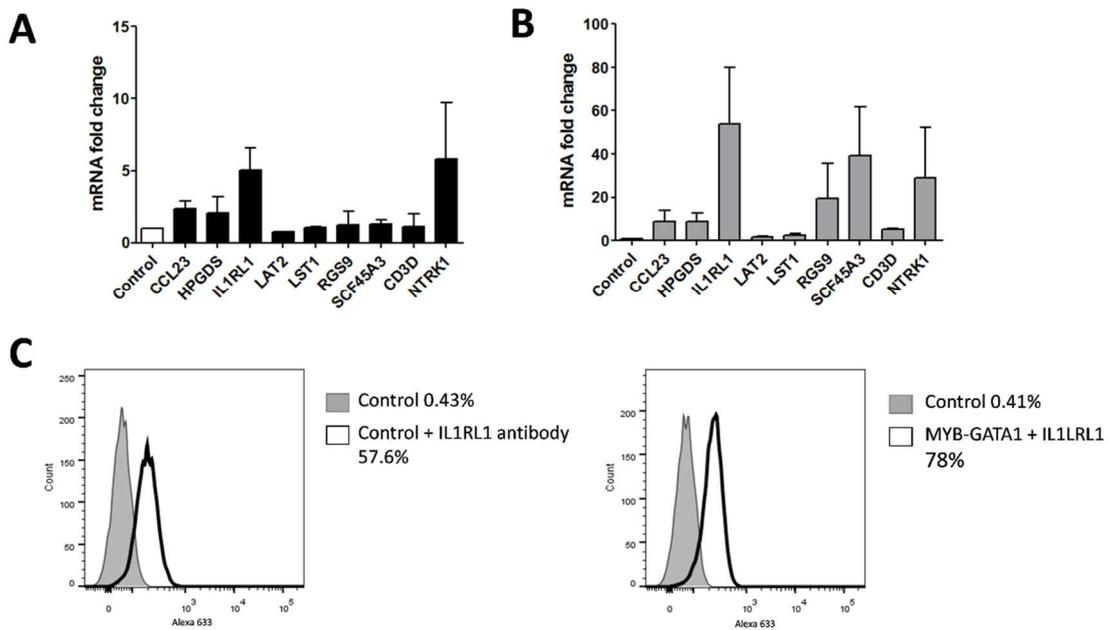


Figure 5

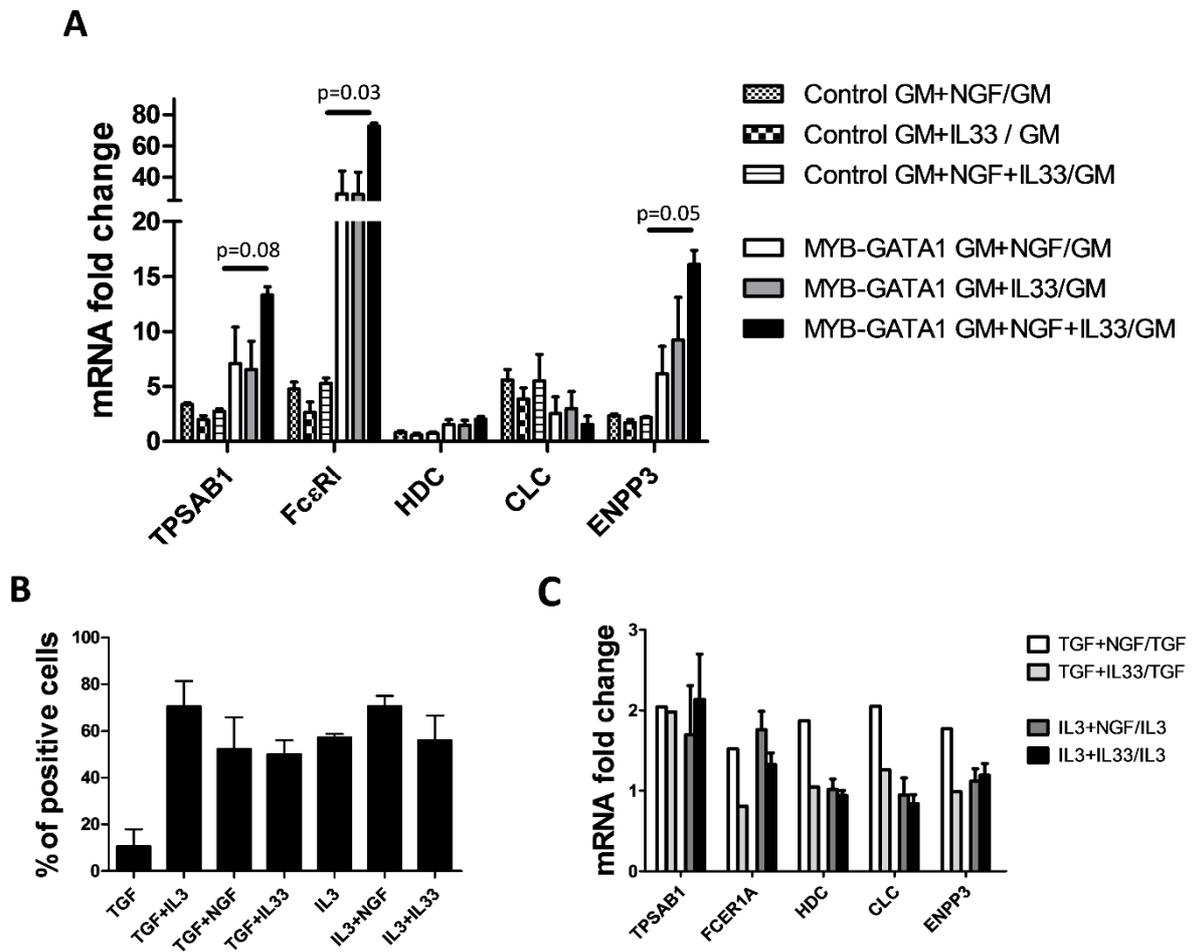


Figure 6

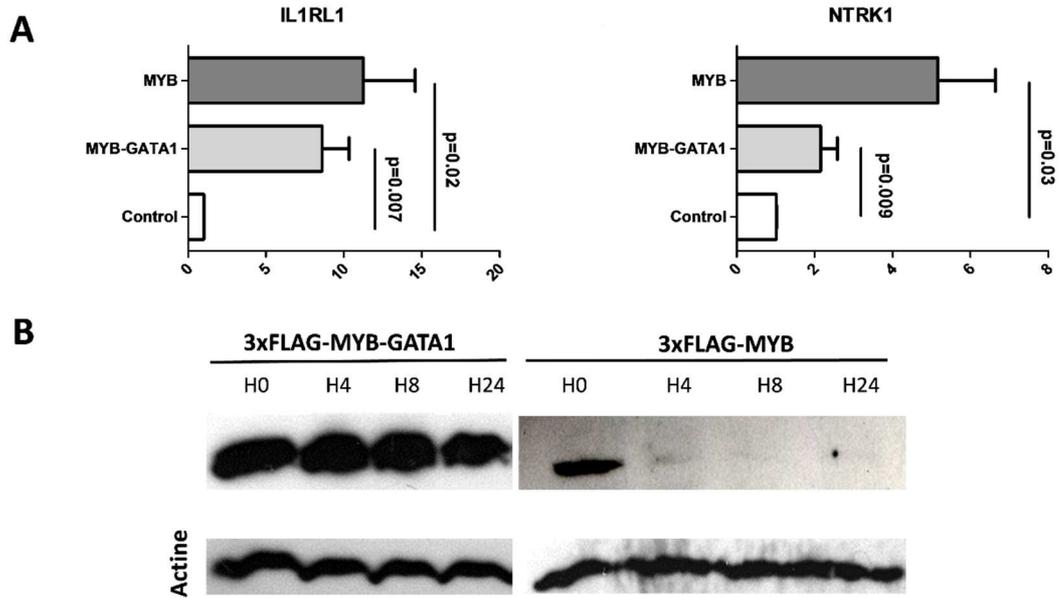


Figure S1

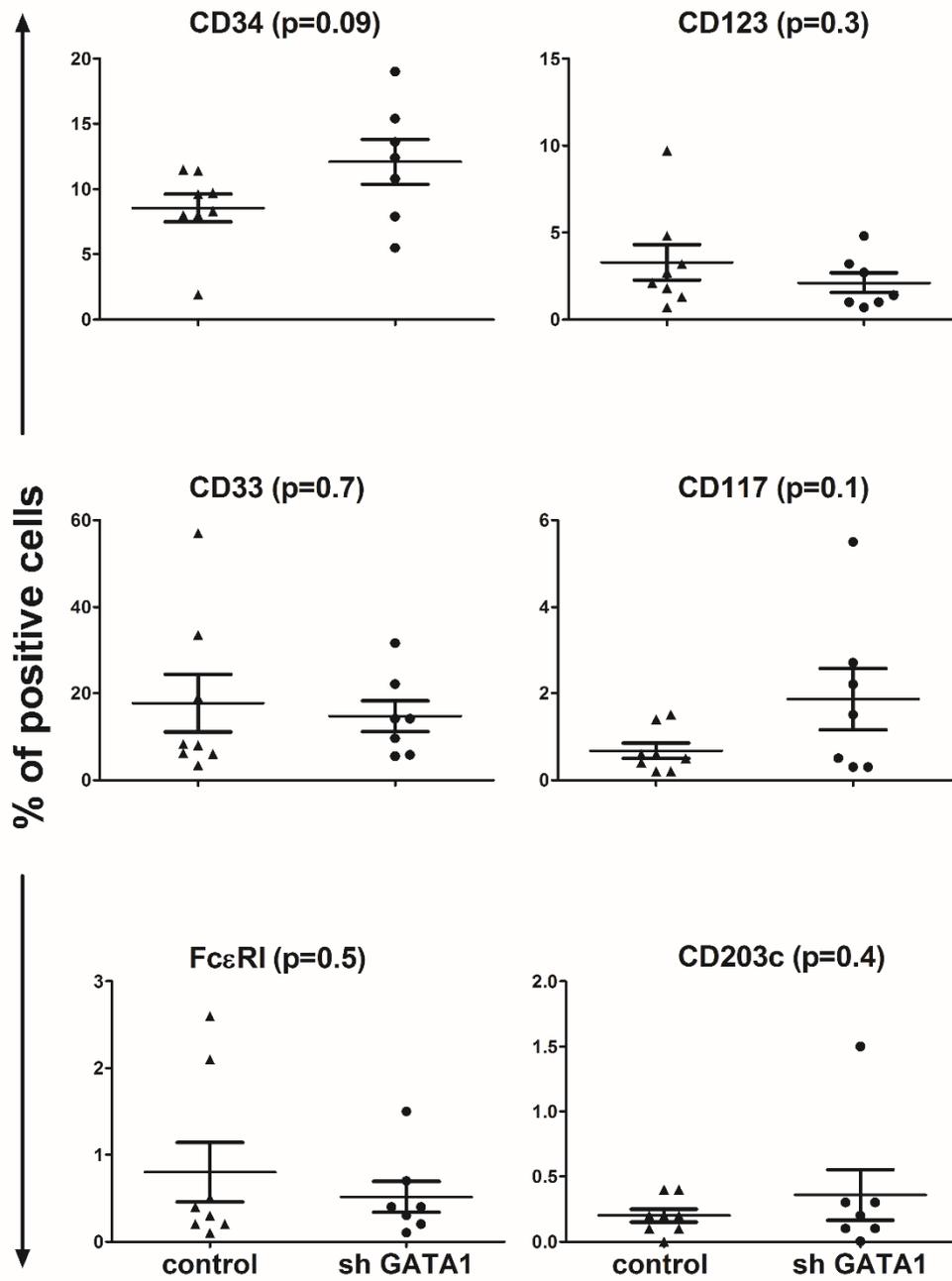
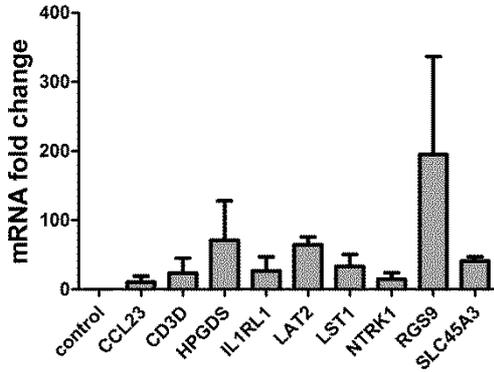
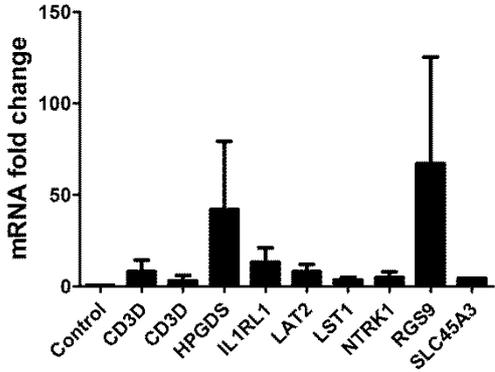


Figure S2



DISCUSSION

Les leucémies aiguës basophiles sont des troubles hématologiques rares, arrivant de novo ou dans le cadre de transformation blastique de leucémies myéloïdes chroniques. Aucune anomalie chromosomique ou génétique spécifique n'avait été liée avec cette pathologie avant que nous n'ayons décrit la translocation t(X;6)(p11;q23). Cette anomalie spécifique est encore plus rare que la LAB elle-même, mais la compréhension de sa pathogénie peut fournir des informations importantes sur des voies de signalisation plus généralement dérégulées dans les LAB aussi bien que dans d'autres pathologies hématologiques avec hyperplasie basophile et dans la basophilopoïèse physiologique. La translocation t(X;6)(p11;q23) conduit à la production d'un gène de fusion *MYB-GATA1* et la disparition du gène *GATA1* (Quelen *et al*, 2011; Belloni *et al*, 2011). En effet, comme *GATA1* est localisé sur le Chromosome X, la translocation élimine l'expression de la protéine *GATA1* dans les cellules affectées de patients masculins. Cependant, le lien entre l'anomalie chromosomique et le phénotype n'a pas été précédemment clairement établi. Même dans le cas de leucémies aiguës myéloïdes associées à une anomalie spécifique, la preuve de la relation existant entre le phénotype observé et l'altération d'origine peut être difficile à mettre en évidence expérimentalement. C'est le cas du gène de fusion *RBM15-MKLI*, qui est associé à une leucémie mégacaryoblastique spécifique, mais qui *in vitro* est associée à une croissance modeste des colonies mégacaryocytaires (Mercher *et al*, 2009). Compte tenu de la faible proportion physiologique de basophiles (1% seulement des cellules circulantes), le lien existant entre une anomalie génique et des trouble de la basophilopoïèse est encore plus difficile à mettre en évidence expérimentalement.

Nous avons choisi d'utiliser des cellules progénitrices de l'hématopoïèse que nous avons mises en conditions cytokiniques leur permettant un développement à long terme après xélogreffe à des souris NSG. Dans ces conditions, après 12 semaines, l'analyse de cellules humaines (après sélection en fonction de l'expression de hCD45) a montré une tendance à l'immaturation avec l'augmentation de l'expression du CD34 des cellules quand *MYB-GATA1*

et *shGATA1* ont été exprimés. Ceci est compatible avec des résultats précédents ayant mis en évidence une augmentation de l'auto-renouvellement des cellules CD34+ dans un modèle murin (Belloni *et al*, 2011). De même les marqueurs myéloïdes, y compris le CD33, sont plus exprimés dans ces cellules ce qui est également en accord avec l'orientation vers la lignée granuleuse précédemment décrite. Ce qui est encore plus intéressant dans le cadre de notre hypothèse, est l'augmentation accrue de Fc ϵ RI et du CD203c qui démontrent que les cellules exprimant les transgènes *MYB-GATA1* et *shGATA1* ont également une tendance à l'orientation basophile. Si l'interprétation de ce résultat peut être discutée en ce qui concerne l'expression de Fc ϵ RI qui est également présent dans d'autres types cellulaires (notamment les cellules mastocytaires et les éosinophiles), l'expression du CD203c semble être tout à fait spécifique des cellules basophiles (Bühning *et al*, 1999). En revanche, nous n'avons pas observé de phénotype totalement leucémique dans les souris transplantées, ce qui indique que *MYB-GATA1* et la diminution de l'expression endogène de *GATA1* dans nos cellules ne sont probablement pas suffisants pour déclencher une leucémie aiguë à basophiles mais nécessite des altérations génétiques supplémentaires, notamment dans des gènes impliqués dans la prolifération. Ceci est probablement ce qui s'est produit dans certains des modèles murins rapportés par Belloni et coll., qui ont développé, avec une pénétrance incomplète, des syndromes myélodysplasiques ou des leucémies après une longue latence (Belloni *et al*, 2011). Puisque le vecteur *MYB-GATA1* exprimait un rapporteur de type tdTomato, tandis que le vecteur *sh-GATA1* exprimait un rapporteur GFP, nous avons pu analyser et comparer, dans les mêmes expériences, des cellules exprimant les deux transgènes ou seulement un des deux qu'il s'agisse de *MYB-GATA1* ou *shGATA1*. La tendance à l'augmentation de l'auto-renouvellement, l'orientation granuleuse et basophile est encore présente dans les cellules exprimant *MYB-GATA1* seul et ceci de manière significative. En revanche, cette tendance n'est pas présente lorsque les cellules analysées expriment seulement le transgène *shGATA1*. Ceci nous a poussé

à formuler l'hypothèse que bien que l'expression de MYB-GATA1 et la diminution de l'expression de GATA1 coopèrent dans le développement du phénotype de nos cas de leucémies aiguës à basophiles, MYB-GATA1 en est le principal acteur. C'est pourquoi, nous avons décidé d'explorer les mécanismes par lesquels cette protéine de fusion pourrait orienter la différenciation des cellules vers la basophilie.

Il est difficile d'obtenir des cellules CD34+ en grande quantité mais également difficile de les transduire avec des transgènes de grande taille (ce qui est le cas de MYB-GATA1) même avec des lentivirus, ce qui induit une baisse de l'efficacité de la transduction même en utilisant des MOI élevées et nécessite la réalisation d'un tri cellulaire pour analyser l'ARNm, responsable lui aussi d'une perte cellulaire relative. Pour ces raisons, nous avons décidé de modéliser les modifications basophiles induites par MYB-GATA1 en utilisant dans un premier temps des lignées cellulaires hématopoïétiques. Quelques lignées cellulaires, comme UT-7 ont précédemment été décrites comme capables de s'orienter vers la basophilie dans des conditions de culture appropriées. Nous avons validé le fait que l'expression de MYB-GATA1, à elle seule, est également capable d'orienter ces cellules vers la basophilie même en condition standard de culture sans cytokine différenciante. Cette orientation n'est pas aussi efficace qu'après stimulation cytokinique associant IL-3 et GM-CSF, mais augmente de manière importante la proportion de cellules positives après utilisation de bleu alcian et l'expression d'un panel de gènes typiquement augmentés au cours de la différenciation basophile (Grundström *et al*, 2012). Ces résultats ont également été confirmés sur des cellules progénitrices hématopoïétiques humaines (CD34+) avec de la même manière, en présence de MYB-GATA1, une augmentation de la proportion de cellules colorées après bleu alcian et une augmentation de l'expression des gènes du panel basophile. Ces résultats renforcent non seulement l'idée que MYB-GATA1 favorise l'engagement vers la basophilie, mais nous ont également permis de valider un modèle

pour des études transcriptomiques afin d'analyser les gènes dérégulés tant par la présence de MYB-GATA1 que par la différenciation basophile induite par les cytokines.

Parmi les gènes dérégulés, neuf ont une augmentation de leur expression à la fois en présence de MYB-GATA1 mais également en cas d'orientation vers la basophilie. Nous en avons déduit que ces gènes pourraient être les médiateurs importants de la différenciation induite par la présence de MYB-GATA1. La pertinence de ces gènes a été confirmée par RT-PCRq dans les cellules UT-7 et sur des cellules primaires de l'hématopoïèse (CD34+). Trois des gènes semblent particulièrement intéressants parce qu'ils sont impliqués dans la signalisation de cytokines/chimiokines : CCL23, le récepteur d'IL-33 IL1RL1 et le récepteur de NGF NTRK1. À notre connaissance, aucune relation entre CCL23 et les basophiles n'a encore été démontrée. Il est cependant intéressant de noter que l'expression de CCL23 est augmentée de manière proportionnelle à la blastose périphérique dans certains cas de leucémies aiguës myéloïdes pédiatriques (en comparaison à des prélèvements de moelle osseuse normale) et que son niveau d'expression a été proposé comme un marqueur potentiel de maladie résiduelle (Steinbach *et al*, 2006). L'interleukine 33 joue clairement un rôle dans la biologie et la genèse des cellules basophiles. Cette cytokine et son récepteur (IL1RL1) ont été impliqués dans la pathogénie allergique (Saluja *et al*, 2015; Pecaric-Petkovic *et al*, 2009). C'est aussi un élément nécessaire à la différenciation des mastocytes (Allakhverdi *et al*, 2007), cellules qui peuvent partager des caractéristiques avec les basophiles. De façon intéressante, le promoteur d'IL1RL1 contient des sites de liaison pour GATA1 ou GATA2 (Baba *et al*, 2012) et pourrait être dérégulé après liaison de la chimère MYB-GATA1, mais les sites de liaison MYB ont aussi été clairement identifiés. De même, NGF est connu pour ses fonctions d'amorçage dans les cellules basophiles matures (Bürgi *et al*, 1996), mais ni la participation de l'IL-33 ni celle des récepteurs NGF dans la différenciation basophile n'a été décrite jusqu'à présent. Nous avons montré que MYB-GATA1 active la transcription d'IL1RL1 et de NTRK1 dans des expériences utilisant les

promoteurs de ces gènes d'intérêt qui contrôlaient l'expression de la luciférase dans des cellules HEK 293. Pour cela nous avons cloné des vecteurs contenant des régions de 1000 pb (1kpb) du promoteur proximal de ces gènes en amont d'un gène luciférase. Tandis que cette approche ne prouve pas complètement que l'activation soit directe, elle nous permet de montrer un effet de MYB-GATA1 sur l'activation de ces gènes. La forme sauvage de MYB permet également une activation transcriptionnelle puissante de ces gènes, suggérant que la chimère cible des sites de liaison MYB dans les promoteurs des gènes cibles. De la même façon, la forme de MYB sans son domaine de régulation négative (MYB Δ Cter) active transcriptionnellement ces gènes et ceci de manière plus importante que MYB sauvage ou MYB-GATA1.

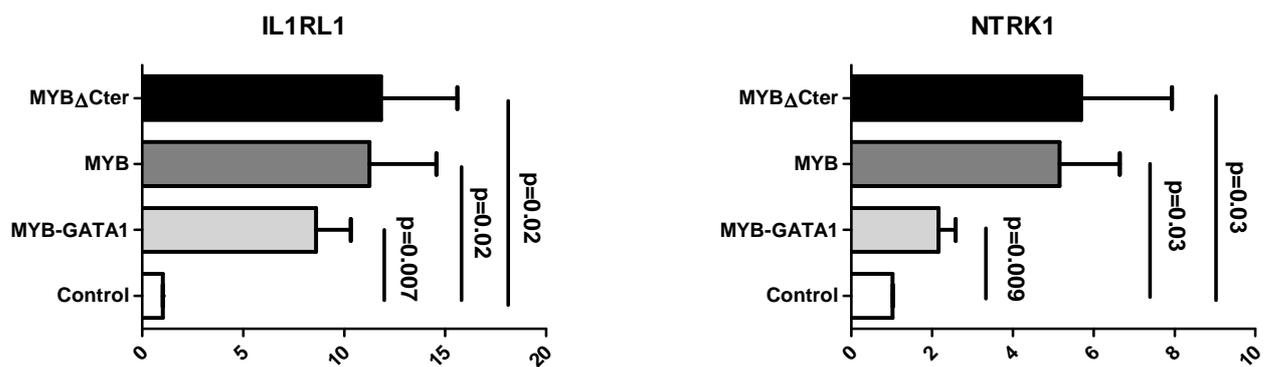


Figure 20: MYB-GATA1 augmente l'activité du promoteur de l'IL1RL1 dans des cellules 293T. L'effet de MYB sauvage, MYB sans son domaine de régulation négative et MYB-GATA1 sur le promoteur d'IL1RL1 a été évalué dans des cellules co-transfectées. Le ratio de luminescence mesuré lorsque les cellules ont été co-transfectées avec un vecteur vide (contrôle) a une valeur de 1. Les données représentent les médianes \pm DS de 4 expériences indépendantes.

Par ailleurs, nous avons pu observer que MYB à l'état sauvage est très rapidement dégradé en moins de 8h tandis que MYB-GATA1 est extrêmement stable, comme cela a été démontré lors d'expérience utilisant la cycloheximide qui permet de bloquer la synthèse protéique. Ainsi l'effet important sur l'expression d'IL1RL1 ou de NTRK1 est beaucoup plus grand dans des cellules leucémiques exprimant MYB-GATA1 que dans des cellules normales exprimant le type sauvage MYB, du fait de cette stabilité augmentée.

Afin de nous rapprocher d'un modèle hématologique, ces expériences de luciférase ont également été réalisées sur des cellules de lignée K562 (modèle d'érythroleucémie) wild type et montre les mêmes tendances activatrices de MYB, MYB-GATA1 ou MYB sans son domaine de régulation négative sur IL1RL1.

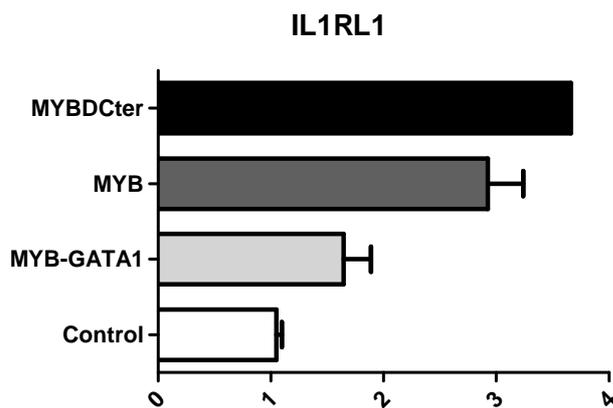


Figure 21: MYB-GATA1 augmente l'activité du promoteur de l'IL1RL1 dans des cellules K562. L'effet de MYB sauvage, MYB sans son domaine de régulation négative et MYB-GATA1 sur le promoteur d'IL1RL1 a été évalué dans des cellules K562 co-transfectées. Le ratio de luminescence mesuré lorsque les cellules ont été co-transfectées avec un vecteur vide (contrôle) a une valeur de 1.

Ensuite, nous avons utilisé un modèle de cellules myéloïdes K562 dans lesquelles l'expression endogène de MYB avait été fortement diminuée après utilisation de la méthode CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) qui consiste à reprogrammer une endonucléase bactérienne (protéine qui coupe l'ADN) appelée **Cas9** avec des petits ARNs non codants (qui agissent comme guide) pour permettre le clivage de manière spécifique à un endroit désiré du génome. Ainsi après des phénomènes de recombinaison on peut observer une disparition ou une diminution de certains gènes d'intérêt ce que nous avons fait pour MYB. Dans ce modèle cellulaire, les mêmes expériences utilisant la luciférase ont été réalisées et nous ont permis de mettre en évidence une activation de l'activation des promoteurs des gènes

IL1RL1 et dans une moindre mesure NTRK1 en présence de MYB-GATA1, MYB ou MYB Δ Cter. Il est intéressant de noter que dans ce modèle présentant un plus faible niveau de MYB endogène, l'augmentation de l'activité de nos promoteurs d'intérêt est significativement plus importante en présence de MYB-GATA1 (Figure 22). Ainsi on peut penser que dans les cellules normales l'expression endogène de MYB est tellement importante qu'elle minore l'effet lié au transgène *MYB-GATA1* ce qui est partiellement corrigé après manipulation de type CRISPR. .

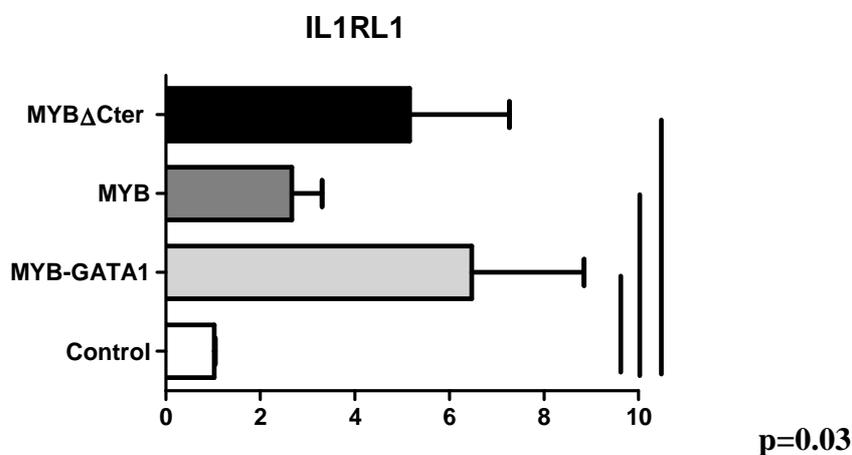


Figure 22: *MYB-GATA1* augmente l'activité du promoteur de l'*IL1RL1* dans des cellules K562 exprimant un faible niveau de *MYB* endogène. L'effet de *MYB* sauvage, *MYB* sans son domaine de régulation négative et *MYB-GATA1* sur le promoteur d'*IL1RL1* a été évalué dans des cellules co-transfectées. Le ratio de luminescence mesuré lorsque les cellules ont été co-transfectées avec un vecteur vide (contrôle) a une valeur de 1. Les données représentent les médianes \pm DS de 3 expériences indépendantes.

Finalement, nos résultats montrent que *MYB-GATA1* promeut la différenciation basophile en sensibilisant des cellules à NGF et IL-33. Parallèlement nous avons testé l'effet des cytokines IL-33 et NGF sur des cellules de lignées cultivées en conditions standard. Nous avons pu observer une augmentation de l'expression des gènes du panel basophile ainsi que de la proportion de cellules colorées au bleu alcian lorsque ces cytokines étaient séparément ajoutées au milieu de culture. Il semble exister un effet synergique de ces cytokines avec une augmentation bien plus importante de l'expression des gènes lorsque les 2 sont ajoutées au

milieu de culture. En revanche, la réversion du phénotype induit par MYB-GATA1 par des anticorps spécifiques de l'IL1RL1 ou du NGF n'a pas été contributive. Cela peut être expliqué pour l'IL1RL1 par la difficulté de neutralisation de ce récepteur, certains auteurs ayant dû utiliser 3 anticorps de manière simultanée pour parvenir à l'inhiber. En ce qui concerne le NGF, l'augmentation de l'expression de son récepteur n'est pas forcément associée à la sécrétion de NGF dans le milieu de culture ce qui peut expliquer l'échec de l'inhibition. L'effet dans des cellules primaires normales est plutôt modeste pour IL-33, ce qui suggère que cette cytokine est plus efficace sur des cellules malignes que des cellules normales. Cela est compatible avec un rapport récent mettant en évidence le rôle de cette cytokine dans l'hématopoïèse maligne (Mager *et al*, 2015). Pris dans leur ensemble, nos résultats ont démontré un rôle pour MYB-GATA1 dans la différenciation basophile, qui peut être attribué à l'augmentation de l'activation des récepteurs pour IL-33 et NGF. Ces cytokines promeuvent aussi la différenciation basophile dans des cellules normales, mais semblent être plus efficaces dans le contexte de l'hématopoïèse pathologique.

Enfin, l'impact du transgène MYB-GATA1 sur la transformation leucémique ne faisait pas directement l'objet de ce travail. Cependant nous pouvons envisager plusieurs hypothèses pour l'expliquer :

- 1) L'impact de MYB-GATA1 sur la dérégulation de certains gènes a été présenté précédemment mais essentiellement sous l'angle de la basophilopoïèse. Cependant ces gènes peuvent également être approchés sous l'angle de la leucémogénèse. En effet, NTRK1 et IL1RL1 dont l'expression est augmentée par la présence de MYB-GATA1 peuvent également intervenir dans la leucémogénèse. Plusieurs études semblent mettre en évidence un rôle des récepteurs de haute affinité aux neurotrophines et notamment NTRK1. Une forme mutée de NTRK1 a été retrouvée chez un patient présentant une LAM de novo ; la délétion entraînait une activation constitutive du domaine tyrosine

kinase conduisant à une phosphorylation de la protéine (Reuther *et al*, 2000). Dans un modèle murin, il a été mis en évidence que cette forme mutée de NTRK1 favorise la transformation blastique des cellules via les voies de signalisation de PI3K et mTOR (Meyer *et al*, 2007). Une autre étude a mis en évidence l'induction de NTRK1 et l'importance de NGF dans la survie de CSH issues de sang placentaire et transduites avec un rétrovirus portant la fusion RUNX1-RUNX1T1 (Mulloy *et al*, 2005). Plus récemment, Li et coll (Li *et al*, 2009) ont étudié l'expression de TRKA (NTRK1), TRKB et TRKC chez des patients présentant une leucémie aiguë. La majorité des patients (55%) présentaient une expression de ces récepteurs, et il existait une corrélation entre l'expression de ces récepteurs et la classification FAB des leucémies et notamment NTRK1 qui était exprimé dans 62% des cas de LAM de type M4 ou M5. Par ailleurs, dans cette même étude, il a été mis en évidence que l'activation des récepteurs TRK est importante pour la survie des cellules leucémiques murines ou humaines. L'implication dans la leucémogénèse d'IL1RL1 a également été évoquée dans une étude récente dans laquelle il a été démontré que IL1RL1 était constitutivement exprimée dans des cellules souches leucémiques et que l'IL-33 favorisait la survie de ces cellules souches (Levescot *et al*, 2014). Par ailleurs, CCL23 est également dérégulée par la présence de MYB-GATA1. Comme nous l'avons vu précédemment cette chimiokine a été proposée comme marqueur de maladie résiduelle en 2006 (Steinbach *et al*, 2006) et validée récemment (Steinbach *et al*, 2015). En effet, sur une cohorte prospective de LAM pédiatrique, il a été montré que la négatification de l'expression de 7 cytokines dont CCL23 était un facteur pronostique indépendant de survie sans rechute plus élevée lorsque la négatification intervient dès J15 (95%) alors qu'elle diminue à 38% si les patients ont une expression de ces gènes persistante à J28. Il a été également montré dans un sous-groupe de patients présentant une LAM que l'apport exogène de

CCL23 au milieu de culture augmente la prolifération des blastes (Bruserud *et al*, 2007). Enfin plus récemment, il a été montré que le niveau d'expression de CCL23 était associé à la sévérité de la mastocytose systémique (Mayado *et al*, 2016). Ainsi CCL23 peut être impliqué dans la leucémogénèse et notamment en pédiatrie, et l'augmentation de son expression en présence de MYB-GATA1 pourrait expliquer en partie le phénotype leucémique observé.

- 2) Par ailleurs d'autres gènes qui n'ont pas été explorés lors de notre étude étaient dérégulés par la présence de MYB-GATA1 et peuvent également être associés à la leucémogénèse. Il s'agit notamment de CCL3, LAT2, et ANXA1. **CCL3** est une chimiokine pro inflammatoire induisant la chimiotaxie des monocytes, des cellules T et B (Davatelis *et al*, 1988) et inhibant la prolifération des progéniteurs précoces de l'hématopoïèse favorisant le maintien en quiescence des CSH (Graham *et al*, 1990). Son récepteur CCR1 est présent à la surface des neutrophiles, éosinophiles, lymphocytes T, monocytes et basophiles. Il a été démontré que les cellules souches leucémiques de LMC étaient résistantes à l'effet inhibiteur de CCL3 (Dürig *et al*, 1999). Récemment (Baba *et al*, 2016), il a été montré que CCL3 est exprimée constitutivement dans les basophiles et que la basophilopoièse pathologique observée dans la LMC peut être favorisée par l'expression de CCL3 qui inhibe l'hématopoïèse normale. En outre, son expression est augmentée en contexte de leucémie et notamment LAM que ce soit sur un modèle murin ou humain (Wang *et al*, 2016). Enfin, dans ce modèle murin de leucémie aiguë, l'augmentation de CCL3 est responsable de la diminution de l'érythropoièse observée et contribue à la prolifération des cellules leucémiques, son inhibition par technique CRISPR aboutissant à une correction de l'anémie et une diminution de la progression leucémique (Wang *et al*, 2016). Ainsi cette chimiokine fait à la fois le lien entre la basophilie et la leucémogénèse. **LAT2** (non T cell activation

linker) est exprimé dans les Cellules B, les NK et les monocytes. Il a été démontré que C-CBL gène retrouvé muté dans les leucémies myélo-monocytaires juvéniles (LMMJ) et LAT2 sous sa forme phosphorylée interagissent au sein des cellules myéloïdes (Brdicka *et al*, 2002). Par ailleurs, un analyse de type CHIP-seq a confirmé que LAT2 est un gène cible de RUNX1-RUNX1T1 et que la protéine de fusion RUNX1-RUNX1T1 se liait à LAT2 (Ptasinska *et al*, 2012). En outre, son expression est régulée de manière épigénétique par RUNX1-RUNX1T1 et par les inhibiteurs d'HDAC (Duque-Afonso *et al*, 2011). Plus récemment son rôle dans l'hématopoïèse normale a été étudié et il a été démontré que son niveau d'expression est faible dans les CSH et augmente au cours de la différenciation myéloïde (Essig *et al*, 2014). En revanche son hyperexpression au sein d'une population CD34+ favorise l'état de quiescence de ces cellules (Essig *et al*, 2014) ce qui pourrait expliquer son rôle dans la leucémogénèse en favorisant l'immaturité des CSH. La dernière molécule d'intérêt dérégulée par MYB-GATA1 est **ANXA1**. Elle appartient à la famille des Annexines qui sont des protéines ayant une forte affinité pour la membrane et qui peuvent être ancrées par des phospholipides et régulées par Ca²⁺. ANXA1 est un inhibiteur fort de la synthèse des eicosanoïdes et de PLA2 (phospholipase A2) et participe à la transduction du signal cellulaire, l'inflammation, la phagocytose, la prolifération, la différenciation et l'apoptose et dans le processus de carcinogénèse. Il a été mis en évidence une augmentation de la protéine ANXA1 chez des patients présentant une évolution de LMC avec crise blastique (Zhang *et al*, 2012). Il a également été montré que ANXA1 participait à la résistance aux drogues dans les cancers qu'il s'agisse de cancers solides ou de leucémies. En effet, Dans des cellules de lignées K562, Zhu et coll., ont mis en évidence un rôle d'ANXA1 dans la résistance aux anthracyclines (Zhu *et al*, 2009). De la même façon, dans 4 sous-types de cancers différents, Zhang et coll ont mis en

évidence que ANXA1 était augmentée après traitement à de faibles doses d'arsenic trioxyde (ATO) et que son inhibition favorisait la sensibilité des cellules à l'ATO (Zhang *et al*, 2015).

3) Un autre anomalie pouvant participer au phénotype leucémogène observé chez nos patients est l'extinction endogène de GATA1. En effet, les patients atteints étant tous de sexe masculin, il existe chez eux une extinction complète de l'expression de la protéine GATA1. Les modèles murins étudiés, Belloni et al (Belloni *et al*, 2011), étaient tout d'abord des modèles dans lesquels il n'existait pas d'extinction de GATA1 et aucune leucémie n'a pu être observée. L'extinction partielle de GATA1 en utilisant des souris GATA1 low ($\leq 10\%$ de l'expression sauvage) a permis d'observer le développement de syndromes myélodysplasiques qui pouvaient faire le lit d'une leucémie aiguë puisque dans un cas une LA s'est développée sans que le second élément ayant pu permettre le développement de cette leucémie puisse être identifié. Les souris reconstituées ont toutes été atteintes de syndromes myélodysplasiques. Toutefois, il apparaît important de noter que les phénotypes oncogéniques rapportés dans les travaux de Belloni sont obtenus à partir de cellules Lin⁻ exprimant faiblement GATA1 et non un niveau nul de GATA1. Par ailleurs, il a récemment été montré que la diminution de l'érythropoïèse, qui accompagne souvent une prolifération leucémique aiguë, peut être liée à la diminution de GATA1. En effet, Wang et coll., (Wang *et al*, 2016) ont démontré que l'augmentation de CCL3 s'accompagnait d'une phosphorylation de p38 qui aboutissait à la diminution de l'expression de GATA1. Ainsi, dans notre modèle, la disparition de l'expression de GATA1 peut participer à la leucémogénèse notamment en majorant l'anémie qui était présente chez tous les nourrissons décrits dans la littérature.

Ainsi dans ce travail, nous avons pu mettre en évidence le rôle de MYB-GATA1 dans la différenciation basophile observée dans notre modèle leucémique. Cette différenciation peut être attribué à l'augmentation de l'activation des récepteurs pour IL-33 et NGF dont les ligands spécifiques (IL33 et NGF) semblent être plus efficaces dans le contexte de l'hématopoïèse pathologique. Les dérégulations induites par la présence de MYB-GATA1 ayant un rôle dans la leucémogénèse restent à explorer tout comme le rôle potentiellement synergique de la disparition de l'expression de GATA1.

PERSPECTIVES

Pour poursuivre ce travail, plusieurs explorations peuvent être envisagées :

- Tout d'abord on peut envisager d'explorer les autres gènes dérégulés et mis en évidence par l'analyse transcriptomique. Pour cela, on envisagerait d'étudier l'impact de ces molécules sur la culture de cellules de lignées en comparant une lignée exprimant MYB-GATA1 et une lignée contrôle. De la même façon, nous pourrions explorer l'impact de ces molécules sur la capacité de différenciation de ces cellules grâce à des techniques de culture cellulaire en milieu semi-solide.
- Afin d'évaluer l'interaction directe qui existe entre MYB-GATA1 et les régions régulatrices de nos gènes cibles par comparaison à MYB sauvage ou MYB sans DRN, dans la fixation du promoteur de nos gènes cibles, nous pourrions exprimer les facteurs de transcription identifiés dans des cellules hématopoïétiques (lignées principalement, voire cellules primaires) puis immunoprécipiter la chromatine fixée à ces facteurs après fixation des cellules (technique ChIP). Afin d'éviter les interférences avec les facteurs de transcription endogènes, nous utiliserions des constructions « taggées ». L'objectif est de montrer que l'immunoprécipitation de MYB-GATA1 entraîne l'ADN correspondant aux promoteurs des gènes d'intérêt dans des conditions de chromatine physiologique. Une PCR quantitative sur les immunoprécipités nous permettant en outre de comparer les différents facteurs de transcription (MYB-GATA1 versus MYB sauvage versus MYB sans DRN), mais aussi de voir dans quelle mesure l'expression de GATA1 ou son atténuation modifie ces interactions, qu'il s'agisse de compétition avec MYB-GATA1 ou de changement d'accessibilité de la chromatine de certains gènes.
- Enfin, parallèlement à ce travail d'étude de régulation transcriptionnelle de nos gènes d'intérêt, leur rôle fonctionnel dans la contribution au phénotype leucémique pourrait également être étudié. Pour cela, nous utiliserions des vecteurs lentiviraux

permettant la surexpression des gènes dérégulés. Les modèles cellulaires sur lesquels nous souhaitons nous appuyer sont principalement les progéniteurs humains normaux dont les capacités d'auto-renouvellement et de différenciation, en particulier vers la lignée basophile, seraient étudiées après cultures à des temps différents en milieu liquide par cytométrie en flux et par capacité à former des colonies en milieu semi-solide, voire, pour les gènes clefs, par greffe à la souris immunodéficiente.

REFERENCES

- Abramson, S., Miller, R.G. & Phillips, R.A. (1977) The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. *The Journal of Experimental Medicine*, **145**, 1567–1579.
- Adolfsson, J., Månsson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C.T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O.-J., Thoren, L.A.M., Anderson, K., Sitnicka, E., Sasaki, Y., Sigvardsson, M. & Jacobsen, S.E.W. (2005) Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell*, **121**, 295–306.
- Agrawal, R., Wisniewski, J., Yu, M.D., Kennedy, J.L., Platts-Mills, T., Heymann, P.W. & Woodfolk, J.A. (2014) Infection with human rhinovirus 16 promotes enhanced IgE responsiveness in basophils of atopic asthmatics. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, **44**, 1266–1273.
- Alcalay, M., Tiacci, E., Bergomas, R., Bigerna, B., Venturini, E., Minardi, S.P., Meani, N., Diverio, D., Bernard, L., Tizzoni, L., Volorio, S., Luzi, L., Colombo, E., Lo Coco, F., Mecucci, C., Falini, B. & Pelicci, P.G. (2005) Acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic nucleophosmin (NPMc+ AML) shows a distinct gene expression profile characterized by up-regulation of genes involved in stem-cell maintenance. *Blood*, **106**, 899–902.
- Allakhverdi, Z., Comeau, M.R., Smith, D.E., Toy, D., Endam, L.M., Desrosiers, M., Liu, Y.-J., Howie, K.J., Denburg, J.A., Gauvreau, G.M. & Delespesse, G. (2009) CD34+ hemopoietic progenitor cells are potent effectors of allergic inflammation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **123**, 472–478.
- Allakhverdi, Z., Smith, D.E., Comeau, M.R. & Delespesse, G. (2007) Cutting edge: The ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **179**, 2051–2054.
- Anfossi, G., Gewirtz, A.M. & Calabretta, B. (1989) An oligomer complementary to c-myc-encoded mRNA inhibits proliferation of human myeloid leukemia cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**, 3379–3383.
- Arber, D.A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M.J., Le Beau, M.M., Bloomfield, C.D., Cazzola, M. & Vardiman, J.W. (2016) The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, **127**, 2391–2405.
- Arinobu, Y., Iwasaki, H., Gurish, M.F., Mizuno, S., Shigematsu, H., Ozawa, H., Tenen, D.G., Austen, K.F. & Akashi, K. (2005a) Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 18105–18110.
- Arinobu, Y., Iwasaki, H., Gurish, M.F., Mizuno, S., Shigematsu, H., Ozawa, H., Tenen, D.G., Austen, K.F. & Akashi, K. (2005b) Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 18105–18110.

- Baba, T., Tanabe, Y., Yoshikawa, S., Yamanishi, Y., Morishita, S., Komatsu, N., Karasuyama, H., Hirao, A. & Mukaida, N. (2016) MIP-1 α /CCL3-expressing basophil-lineage cells drive the leukemic hematopoiesis of chronic myeloid leukemia in mice. *Blood*, **127**, 2607–2617.
- Baba, Y., Maeda, K., Yashiro, T., Inage, E., Kasakura, K., Suzuki, R., Niyonsaba, F., Hara, M., Tanabe, A., Ogawa, H., Okumura, K., Ohtsuka, Y., Shimizu, T. & Nishiyama, C. (2012) GATA2 is a critical transactivator for the human IL1RL1/ST2 promoter in mast cells/basophils: opposing roles for GATA2 and GATA1 in human IL1RL1/ST2 gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*, **287**, 32689–32696.
- Bacher, U., Haferlach, T., Schoch, C., Kern, W. & Schnittger, S. (2006) Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients. *Blood*, **107**, 3847–3853.
- Banno, K., Omori, S., Hirata, K., Nawa, N., Nakagawa, N., Nishimura, K., Ohtaka, M., Nakanishi, M., Sakuma, T., Yamamoto, T., Toki, T., Ito, E., Yamamoto, T., Kokubu, C., Takeda, J., Taniguchi, H., Arahori, H., Wada, K., Kitabatake, Y. & Ozono, K. (2016) Systematic Cellular Disease Models Reveal Synergistic Interaction of Trisomy 21 and GATA1 Mutations in Hematopoietic Abnormalities. *Cell Reports*, **15**, 1228–1241.
- Barletta, C., Pelicci, P.G., Kenyon, L.C., Smith, S.D. & Dalla-Favera, R. (1987) Relationship between the c-myc locus and the 6q-chromosomal aberration in leukemias and lymphomas. *Science (New York, N.Y.)*, **235**, 1064–1067.
- Bartůnek, P., Králová, J., Blendinger, G., Dvorač, M. & Zenke, M. (2003) GATA-1 and c-myc crosstalk during red blood cell differentiation through GATA-1 binding sites in the c-myc promoter. *Oncogene*, **22**, 1927–1935.
- Belloni, E., Shing, D., Tapinassi, C., Viale, A., Mancuso, P., Malazzi, O., Gerbino, E., Dall'olio, V., Egurbide, I., Odero, M.D., Bertolini, F. & Giuseppe Pelicci, P. (2011) In vivo expression of an aberrant MYB-GATA1 fusion induces leukemia in the presence of GATA1 reduced levels. *Leukemia*, **25**, 733–736.
- Bene, M.C., Castoldi, G., Knapp, W., Ludwig, W.D., Matutes, E., Orfao, A. & van't Veer, M.B. (1995) Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*, **9**, 1783–1786.
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R. & Sultan, C. (1976) Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *British Journal of Haematology*, **33**, 451–458.
- Benthaus, T., Schneider, F., Mellert, G., Zellmeier, E., Schneider, S., Kakadia, P.M., Hiddemann, W., Bohlander, S.K., Feuring-Buske, M., Braess, J., Spiekermann, K. & Dufour, A. (2008) Rapid and sensitive screening for CEBPA mutations in acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*, **143**, 230–239.
- Biedenkapp, H., Borgmeyer, U., Sippel, A.E. & Klempnauer, K.H. (1988) Viral myb oncogene encodes a sequence-specific DNA-binding activity. *Nature*, **335**, 835–837.
- Bischoff, S.C. & Dahinden, C.A. (1992) Effect of nerve growth factor on the release of inflammatory mediators by mature human basophils. *Blood*, **79**, 2662–2669.

- Blobel, G.A., Nakajima, T., Eckner, R., Montminy, M. & Orkin, S.H. (1998) CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 2061–2066.
- Bowen, D.T., Frew, M.E., Hills, R., Gale, R.E., Wheatley, K., Groves, M.J., Langabeer, S.E., Kottaridis, P.D., Moorman, A.V., Burnett, A.K. & Linch, D.C. (2005) RAS mutation in acute myeloid leukemia is associated with distinct cytogenetic subgroups but does not influence outcome in patients younger than 60 years. *Blood*, **106**, 2113–2119.
- Brdicka, T., Imrich, M., Angelisová, P., Brdicková, N., Horváth, O., Spicka, J., Hilgert, I., Lusková, P., Dráber, P., Novák, P., Engels, N., Wienands, J., Simeoni, L., Osterreicher, J., Aguado, E., Malissen, M., Schraven, B. & Horejsí, V. (2002) Non-T cell activation linker (NTAL): a transmembrane adaptor protein involved in immunoreceptor signaling. *The Journal of Experimental Medicine*, **196**, 1617–1626.
- Breems, D.A., Van Putten, W.L.J., De Greef, G.E., Van Zelderen-Bhola, S.L., Gerssen-Schoorl, K.B.J., Mellink, C.H.M., Nieuwint, A., Jotterand, M., Hagemeyer, A., Beverloo, H.B. & Löwenberg, B. (2008) Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **26**, 4791–4797.
- Bresnick, E.H., Lee, H.-Y., Fujiwara, T., Johnson, K.D. & Keles, S. (2010) GATA switches as developmental drivers. *The Journal of Biological Chemistry*, **285**, 31087–31093.
- Bruserud, Ø., Rynningen, A., Olsnes, A.M., Stordrange, L., Øyan, A.M., Kalland, K.H. & Gjertsen, B.T. (2007) Subclassification of patients with acute myelogenous leukemia based on chemokine responsiveness and constitutive chemokine release by their leukemic cells. *Haematologica*, **92**, 332–341.
- Bühring, H.J., Simmons, P.J., Pudney, M., Müller, R., Jarrossay, D., van Agthoven, A., Willheim, M., Brugger, W., Valent, P. & Kanz, L. (1999) The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors. *Blood*, **94**, 2343–2356.
- Burda, P., Vargova, J., Curik, N., Salek, C., Papadopoulos, G.L., Strouboulis, J. & Stopka, T. (2016) GATA-1 Inhibits PU.1 Gene via DNA and Histone H3K9 Methylation of Its Distal Enhancer in Erythroleukemia. *PLoS One*, **11**, e0152234.
- Bürigi, B., Otten, U.H., Ochensberger, B., Rihs, S., Heese, K., Ehrhard, P.B., Ibanez, C.F. & Dahinden, C.A. (1996a) Basophil priming by neurotrophic factors. Activation through the trk receptor. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **157**, 5582–5588.
- Bürigi, B., Otten, U.H., Ochensberger, B., Rihs, S., Heese, K., Ehrhard, P.B., Ibanez, C.F. & Dahinden, C.A. (1996b) Basophil priming by neurotrophic factors. Activation through the trk receptor. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **157**, 5582–5588.
- Calabretta, B. & Gewirtz, A.M. (1991) Functional requirements of c-myc during normal and leukemic hematopoiesis. *Critical Reviews in Oncogenesis*, **2**, 187–194.

- Cantor, A.B., Iwasaki, H., Arinobu, Y., Moran, T.B., Shigematsu, H., Sullivan, M.R., Akashi, K. & Orkin, S.H. (2008) Antagonism of FOG-1 and GATA factors in fate choice for the mast cell lineage. *The Journal of Experimental Medicine*, **205**, 611–624.
- Chen, C.-C., Yang, C.-F., Lee, K.-D., You, J.-Y., Yu, Y.-B., Ho, C.-H., Tzeng, C.-H., Chau, W.-K., Hsu, H.-C. & Gau, J.-P. (2007) Complex karyotypes confer a poor survival in adult acute myeloid leukemia with unfavorable cytogenetic abnormalities. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **174**, 138–146.
- Chou, S.T., Khandros, E., Bailey, L.C., Nichols, K.E., Vakoc, C.R., Yao, Y., Huang, Z., Crispino, J.D., Hardison, R.C., Blobel, G.A. & Weiss, M.J. (2009) Graded repression of PU.1/Sfp1 gene transcription by GATA factors regulates hematopoietic cell fate. *Blood*, **114**, 983–994.
- Civin, C.I., Strauss, L.C., Brovall, C., Fackler, M.J., Schwartz, J.F. & Shaper, J.H. (1984) Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **133**, 157–165.
- Clappier, E., Cucchini, W., Kalota, A., Crinquette, A., Cayuela, J.-M., Dik, W.A., Langerak, A.W., Montpellier, B., Nadel, B., Walrafen, P., Delattre, O., Aurias, A., Leblanc, T., Dombret, H., Gewirtz, A.M., Baruchel, A., Sigaux, F. & Soulier, J. (2007) The C-MYB locus is involved in chromosomal translocation and genomic duplications in human T-cell acute leukemia (T-ALL), the translocation defining a new T-ALL subtype in very young children. *Blood*, **110**, 1251–1261.
- Clavel, J., Goubin, A., Auclerc, M.F., Auvrignon, A., Waterkeyn, C., Patte, C., Baruchel, A., Leverger, G., Nelken, B., Philippe, N., Sommelet, D., Vilmer, E., Bellec, S., Perrillat-Menegaux, F. & Hémon, D. (2004) Incidence of childhood leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma in France: National Registry of Childhood Leukaemia and Lymphoma, 1990-1999. *European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, **13**, 97–103.
- Dash, A.B., Orrico, F.C. & Ness, S.A. (1996) The EVES motif mediates both intermolecular and intramolecular regulation of c-Myb. *Genes & Development*, **10**, 1858–1869.
- Dastugue, N., Duchayne, E., Kuhlein, E., Rubie, H., Demur, C., Aurich, J., Robert, A. & Sie, P. (1997) Acute basophilic leukaemia and translocation t(X;6)(p11;q23). *British Journal of Haematology*, **98**, 170–176.
- Davatelis, G., Tekamp-Olson, P., Wolpe, S.D., Hermsen, K., Luedke, C., Gallegos, C., Coit, D., Merryweather, J. & Cerami, A. (1988) Cloning and characterization of a cDNA for murine macrophage inflammatory protein (MIP), a novel monokine with inflammatory and chemokinetic properties. *The Journal of Experimental Medicine*, **167**, 1939–1944.
- DeKoter, R.P. & Singh, H. (2000) Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science (New York, N.Y.)*, **288**, 1439–1441.
- Delhommeau, F., Dupont, S., Della Valle, V., James, C., Trannoy, S., Massé, A., Kosmider, O., Le Couedic, J.-P., Robert, F., Alberdi, A., Lécluse, Y., Plo, I., Dreyfus, F.J., Marzac, C., Casadevall, N., Lacombe, C., Romana, S.P., Dessen, P., Soulier, J., Viguie, F., et al

- (2009) Mutation in TET2 in myeloid cancers. *The New England Journal of Medicine*, **360**, 2289–2301.
- Denburg, J.A., Telizyn, S., Messner, H., Lim, B., Jamal, N., Ackerman, S.J., Gleich, G.J. & Bienenstock, J. (1985) Heterogeneity of human peripheral blood eosinophil-type colonies: evidence for a common basophil-eosinophil progenitor. *Blood*, **66**, 312–318.
- Didichenko, S.A., Spiegl, N., Brunner, T. & Dahinden, C.A. (2008) IL-3 induces a Pim1-dependent antiapoptotic pathway in primary human basophils. *Blood*, **112**, 3949–3958.
- Ding, L., Ley, T.J., Larson, D.E., Miller, C.A., Koboldt, D.C., Welch, J.S., Ritchey, J.K., Young, M.A., Lamprecht, T., McLellan, M.D., McMichael, J.F., Wallis, J.W., Lu, C., Shen, D., Harris, C.C., Dooling, D.J., Fulton, R.S., Fulton, L.L., Chen, K., Schmidt, H., et al (2012) Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, **481**, 506–510.
- Duchayne, E., Demur, C., Rubie, H., Robert, A. & Dastugue, N. (1999) Diagnosis of acute basophilic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, **32**, 269–278.
- Duque-Afonso, J., Solari, L., Essig, A., Berg, T., Pahl, H.L. & Lübbert, M. (2011) Regulation of the adaptor molecule LAT2, an in vivo target gene of AML1/ETO (RUNX1/RUNX1T1), during myeloid differentiation. *British Journal of Haematology*, **153**, 612–622.
- Dürig, J., Testa, N.G., Lord, B.I., Kasper, C., Chang, J., Telford, N., Dexter, T.M. & Heyworth, C.M. (1999) Characterisation of the differential response of normal and CML haemopoietic progenitor cells to macrophage inflammatory protein-1alpha. *Leukemia*, **13**, 2012–2022.
- Dy, M., Pacilio, M., Arnould, A., Machavoine, F., Mayeux, P., Hermine, O., Bodger, M. & Schneider, E. (1999) Modulation of histidine decarboxylase activity and cytokine synthesis in human leukemic cell lines: relationship with basophilic and/or megakaryocytic differentiation. *Experimental Hematology*, **27**, 1295–1305.
- Ebi, Y., Kasugai, T., Seino, Y., Onoue, H., Kanemoto, T. & Kitamura, Y. (1990) Mechanism of mast cell deficiency in mutant mice of mi/mi genotype: an analysis by co-culture of mast cells and fibroblasts. *Blood*, **75**, 1247–1251.
- Eisenmann, K.M., Dykema, K.J., Matheson, S.F., Kent, N.F., DeWard, A.D., West, R.A., Tibes, R., Furge, K.A. & Alberts, A.S. (2009) 5q- myelodysplastic syndromes: chromosome 5q genes direct a tumor-suppression network sensing actin dynamics. *Oncogene*, **28**, 3429–3441.
- Essig, A., Duque-Afonso, J., Schwemmers, S., Pahl, H.L. & Lübbert, M. (2014) The AML1/ETO target gene LAT2 interferes with differentiation of normal hematopoietic precursor cells. *Leukemia Research*, **38**, 340–345.
- Eveillard, M. & Desjonqueres, A. (2014) Acute basophilic leukemia. *Blood*, **123**, 3071.
- Falini, B., Gionfriddo, I., Cecchetti, F., Ballanti, S., Pettirossi, V. & Martelli, M.P. (2011) Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): Any hope for a targeted therapy? *Blood Reviews*, **25**, 247–254.

- Ferreira, R., Ohneda, K., Yamamoto, M. & Philipsen, S. (2005) GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Molecular and Cellular Biology*, **25**, 1215–1227.
- Figueroa, M.E., Abdel-Wahab, O., Lu, C., Ward, P.S., Patel, J., Shih, A., Li, Y., Bhagwat, N., Vasanthakumar, A., Fernandez, H.F., Tallman, M.S., Sun, Z., Wolniak, K., Peeters, J.K., Liu, W., Choe, S.E., Fantin, V.R., Paietta, E., Löwenberg, B., Licht, J.D., et al (2010) Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*, **18**, 553–567.
- Fox, N., Priestley, G., Papayannopoulou, T. & Kaushansky, K. (2002) Thrombopoietin expands hematopoietic stem cells after transplantation. *The Journal of Clinical Investigation*, **110**, 389–394.
- Frank, R., Zhang, J., Uchida, H., Meyers, S., Hiebert, S.W. & Nimer, S.D. (1995) The AML1/ETO fusion protein blocks transactivation of the GM-CSF promoter by AML1B. *Oncogene*, **11**, 2667–2674.
- Freson, K., Devriendt, K., Matthijs, G., Van Hoof, A., De Vos, R., Thys, C., Minner, K., Hoylaerts, M.F., Vermeylen, J. & Van Geet, C. (2001) Platelet characteristics in patients with X-linked macrothrombocytopenia because of a novel GATA1 mutation. *Blood*, **98**, 85–92.
- Fujimaki, S., Harigae, H., Sugawara, T., Takasawa, N., Sasaki, T. & Kaku, M. (2001) Decreased expression of transcription factor GATA-2 in haematopoietic stem cells in patients with aplastic anaemia. *British Journal of Haematology*, **113**, 52–57.
- Gibbs, B.F., Haas, H., Falcone, F.H., Albrecht, C., Vollrath, I.B., Noll, T., Wolff, H.H. & Amon, U. (1996) Purified human peripheral blood basophils release interleukin-13 and preformed interleukin-4 following immunological activation. *European Journal of Immunology*, **26**, 2493–2498.
- Gibbs, B.F., Zillikens, D. & Grabbe, J. (2005) Nerve growth factor influences IgE-mediated human basophil activation: functional properties and intracellular mechanisms compared with IL-3. *International Immunopharmacology*, **5**, 735–747.
- Gonda, T.J., Buckmaster, C. & Ramsay, R.G. (1989) Activation of c-myb by carboxy-terminal truncation: relationship to transformation of murine haemopoietic cells in vitro. *The EMBO journal*, **8**, 1777–1783.
- Goubin, A., Auclerc, M.F., Auvrignon, A., Patte, C., Bergeron, C., Hémon, D. & Clavel, J. (2006) Survival in France after childhood acute leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma (1990-2000). *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, **42**, 534–541.
- Graham, G.J., Wright, E.G., Hewick, R., Wolpe, S.D., Wilkie, N.M., Donaldson, D., Lorimore, S. & Pragnell, I.B. (1990) Identification and characterization of an inhibitor of haemopoietic stem cell proliferation. *Nature*, **344**, 442–444.
- Greaves, M.F., Maia, A.T., Wiemels, J.L. & Ford, A.M. (2003) Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood*, **102**, 2321–2333.

- Grundström, J., Reimer, J.M., Magnusson, S.E., Nilsson, G., Wernersson, S. & Hellman, L. (2012) Human cord blood derived immature basophils show dual characteristics, expressing both basophil and eosinophil associated proteins. *PLoS One*, **7**, e48308.
- Gupta, R., Jain, P. & Anand, M. (2004) Acute basophilic leukemia: case report. *American Journal of Hematology*, **76**, 134–138.
- Harada, Y. & Harada, H. (2009) Molecular pathways mediating MDS/AML with focus on AML1/RUNX1 point mutations. *Journal of Cellular Physiology*, **220**, 16–20.
- Harigae, H., Takahashi, S., Suwabe, N., Ohtsu, H., Gu, L., Yang, Z., Tsai, F.Y., Kitamura, Y., Engel, J.D. & Yamamoto, M. (1998) Differential roles of GATA-1 and GATA-2 in growth and differentiation of mast cells. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, **3**, 39–50.
- Hasemann, M.S., Lauridsen, F.K.B., Waage, J., Jakobsen, J.S., Frank, A.-K., Schuster, M.B., Rapin, N., Bagger, F.O., Hoppe, P.S., Schroeder, T. & Porse, B.T. (2014) C/EBP α is required for long-term self-renewal and lineage priming of hematopoietic stem cells and for the maintenance of epigenetic configurations in multipotent progenitors. *PLoS genetics*, **10**, e1004079.
- Hasle, H., Alonzo, T.A., Auvrignon, A., Behar, C., Chang, M., Creutzig, U., Fischer, A., Forestier, E., Fynn, A., Haas, O.A., Harbott, J., Harrison, C.J., Heerema, N.A., van den Heuvel-Eibrink, M.M., Kaspers, G.J.L., Locatelli, F., Noellke, P., Polychronopoulou, S., Ravindranath, Y., Razzouk, B., et al (2007) Monosomy 7 and deletion 7q in children and adolescents with acute myeloid leukemia: an international retrospective study. *Blood*, **109**, 4641–4647.
- Hermine, O., Mayeux, P., Titeux, M., Mitjavila, M.T., Casadevall, N., Guichard, J., Komatsu, N., Suda, T., Miura, Y. & Vainchenker, W. (1992) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and erythropoietin act competitively to induce two different programs of differentiation in the human pluripotent cell line UT-7. *Blood*, **80**, 3060–3069.
- Hess, J.L., Bittner, C.B., Zeisig, D.T., Bach, C., Fuchs, U., Borkhardt, A., Frampton, J. & Slany, R.K. (2006) c-Myb is an essential downstream target for homeobox-mediated transformation of hematopoietic cells. *Blood*, **108**, 297–304.
- Hill, D.A. & Artis, D. (2013) The influence of commensal bacteria-derived signals on basophil-associated allergic inflammation. *Gut Microbes*, **4**, 76–83.
- Ho, P.A., Alonzo, T.A., Gerbing, R.B., Pollard, J., Stirewalt, D.L., Hurwitz, C., Heerema, N.A., Hirsch, B., Raimondi, S.C., Lange, B., Franklin, J.L., Radich, J.P. & Meshinchi, S. (2009) Prevalence and prognostic implications of CEBPA mutations in pediatric acute myeloid leukemia (AML): a report from the Children's Oncology Group. *Blood*, **113**, 6558–6566.
- Huang, H. & Li, Y. (2014) Mechanisms controlling mast cell and basophil lineage decisions. *Current Allergy and Asthma Reports*, **14**, 457.
- Hui, C.C.K., Rusta-Sallehy, S., Asher, I., Heroux, D. & Denburg, J.A. (2014) The effects of thymic stromal lymphopoietin and IL-3 on human eosinophil-basophil lineage

- commitment: Relevance to atopic sensitization. *Immunity, Inflammation and Disease*, **2**, 44–55.
- Iwasaki, H., Mizuno, S., Arinobu, Y., Ozawa, H., Mori, Y., Shigematsu, H., Takatsu, K., Tenen, D.G. & Akashi, K. (2006a) The order of expression of transcription factors directs hierarchical specification of hematopoietic lineages. *Genes & Development*, **20**, 3010–3021.
- Iwasaki, H., Mizuno, S., Arinobu, Y., Ozawa, H., Mori, Y., Shigematsu, H., Takatsu, K., Tenen, D.G. & Akashi, K. (2006b) The order of expression of transcription factors directs hierarchical specification of hematopoietic lineages. *Genes & Development*, **20**, 3010–3021.
- Jankovic, D., Gorello, P., Liu, T., Ehret, S., La Starza, R., Desjobert, C., Baty, F., Brutsche, M., Jayaraman, P.-S., Santoro, A., Mecucci, C. & Schwaller, J. (2008) Leukemogenic mechanisms and targets of a NUP98/HHEX fusion in acute myeloid leukemia. *Blood*, **111**, 5672–5682.
- Jiang, J., Best, S., Menzel, S., Silver, N., Lai, M.I., Surdulescu, G.L., Spector, T.D. & Thein, S.L. (2006) cMYB is involved in the regulation of fetal hemoglobin production in adults. *Blood*, **108**, 1077–1083.
- Katsura, Y. & Kawamoto, H. (2001) Stepwise lineage restriction of progenitors in lymphomyelopoiesis. *International Reviews of Immunology*, **20**, 1–20.
- Kaushansky, K. (2006) Lineage-specific hematopoietic growth factors. *The New England Journal of Medicine*, **354**, 2034–2045.
- Kawamoto, H., Ikawa, T., Masuda, K., Wada, H. & Katsura, Y. (2010) A map for lineage restriction of progenitors during hematopoiesis: the essence of the myeloid-based model. *Immunological Reviews*, **238**, 23–36.
- Kempski, H., Mensa-Bonsu, K.A., Kearney, L., Jalali, G.R., Hann, I., Khurshid, M. & Greaves, M. (2003) Prenatal chromosomal diversification of leukemia in monozygotic twins. *Genes, Chromosomes & Cancer*, **37**, 406–411.
- Kiel, M.J., Yilmaz, O.H., Iwashita, T., Yilmaz, O.H., Terhorst, C. & Morrison, S.J. (2005) SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*, **121**, 1109–1121.
- Kim, D.K., Morii, E., Ogihara, H., Lee, Y.M., Jippo, T., Adachi, S., Maeyama, K., Kim, H.M. & Kitamura, Y. (1999) Different effect of various mutant MITF encoded by mi, Mior, or Miwh allele on phenotype of murine mast cells. *Blood*, **93**, 4179–4186.
- Kitamura, Y., Oboki, K. & Ito, A. (2006) Molecular mechanisms of mast cell development. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, **26**, 387–405; v.
- Klemsz, M.J., McKercher, S.R., Celada, A., Van Beveren, C. & Maki, R.A. (1990) The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. *Cell*, **61**, 113–124.

- Kobayashi, H., Butler, J.M., O'Donnell, R., Kobayashi, M., Ding, B.-S., Bonner, B., Chiu, V.K., Nolan, D.J., Shido, K., Benjamin, L. & Rafii, S. (2010) Angiocrine factors from Akt-activated endothelial cells balance self-renewal and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nature Cell Biology*, **12**, 1046–1056.
- Kraft, S. & Kinet, J.-P. (2007) New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. *Nature Reviews. Immunology*, **7**, 365–378.
- Kummaluru, T. & Friedman, A.D. (2003) Cross-talk between regulators of myeloid development: C/EBPα binds and activates the promoter of the PU.1 gene. *Journal of Leukocyte Biology*, **74**, 464–470.
- Lahortiga, I., De Keersmaecker, K., Van Vlierberghe, P., Graux, C., Cauwelier, B., Lambert, F., Mentens, N., Beverloo, H.B., Pieters, R., Speleman, F., Odero, M.D., Bauters, M., Froyen, G., Marynen, P., Vandenberghe, P., Wlodarska, I., Meijerink, J.P.P. & Cools, J. (2007) Duplication of the MYB oncogene in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics*, **39**, 593–595.
- Lantz, C.S., Boesiger, J., Song, C.H., Mach, N., Kobayashi, T., Mulligan, R.C., Nawa, Y., Dranoff, G. & Galli, S.J. (1998) Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature*, **392**, 90–93.
- Lauder, A., Castellanos, A. & Weston, K. (2001) c-Myb transcription is activated by protein kinase B (PKB) following interleukin 2 stimulation of T cells and is required for PKB-mediated protection from apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, **21**, 5797–5805.
- Leary, A.G. & Ogawa, M. (1984) Identification of pure and mixed basophil colonies in culture of human peripheral blood and marrow cells. *Blood*, **64**, 78–83.
- Leek, J.T. & Storey, J.D. (2007) Capturing heterogeneity in gene expression studies by surrogate variable analysis. *PLoS genetics*, **3**, 1724–1735.
- Leroy, H., Roumier, C., Huyghe, P., Biggio, V., Fenaux, P. & Preudhomme, C. (2005) CEBPA point mutations in hematological malignancies. *Leukemia*, **19**, 329–334.
- Levescot, A., Flamant, S., Basbous, S., Jacomet, F., Féraud, O., Anne Bourgeois, E., Bonnet, M.-L., Giraud, C., Roy, L., Barra, A., Chomel, J.-C., Turhan, A., Guilhot, F., Girard, J.-P., Gombert, J.-M. & Herbelin, A. (2014) BCR-ABL-induced deregulation of the IL-33/ST2 pathway in CD34+ progenitors from chronic myeloid leukemia patients. *Cancer Research*, **74**, 2669–2676.
- Li, Y., Qi, X., Liu, B. & Huang, H. (2015) The STAT5-GATA2 Pathway Is Critical in Basophil and Mast Cell Differentiation and Maintenance. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **194**, 4328–4338.
- Li, Z., Beutel, G., Rhein, M., Meyer, J., Koenecke, C., Neumann, T., Yang, M., Krauter, J., Neuhoﬀ, N. von, Heuser, M., Diedrich, H., Göhring, G., Wilkens, L., Schlegelberger, B., Ganser, A. & Baum, C. (2009) High-affinity neurotrophin receptors and ligands promote leukemogenesis. *Blood*, **113**, 2028–2037.

- Li, Z., Godinho, F.J., Klusmann, J.-H., Garriga-Canut, M., Yu, C. & Orkin, S.H. (2005) Developmental stage-selective effect of somatically mutated leukemogenic transcription factor GATA1. *Nature Genetics*, **37**, 613–619.
- Lidonnici, M.R., Corradini, F., Waldron, T., Bender, T.P. & Calabretta, B. (2008) Requirement of c-Myb for p210(BCR/ABL)-dependent transformation of hematopoietic progenitors and leukemogenesis. *Blood*, **111**, 4771–4779.
- Lieu, Y.K. & Reddy, E.P. (2009) Conditional c-myb knockout in adult hematopoietic stem cells leads to loss of self-renewal due to impaired proliferation and accelerated differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 21689–21694.
- Lipsick, J.S. & Baluda, M.A. (1986) The myb oncogene. *Gene Amplification and Analysis*, **4**, 73–98.
- Mackay, J.P., Kowalski, K., Fox, A.H., Czolij, R., King, G.F. & Crossley, M. (1998) Involvement of the N-finger in the self-association of GATA-1. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**, 30560–30567.
- Mager, L.F., Riether, C., Schürch, C.M., Banz, Y., Wasmer, M.-H., Stuber, R., Theocharides, A.P., Li, X., Xia, Y., Saito, H., Nakae, S., Baerlocher, G.M., Manz, M.G., McCoy, K.D., Macpherson, A.J., Ochsenbein, A.F., Beutler, B. & Krebs, P. (2015) IL-33 signaling contributes to the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *The Journal of Clinical Investigation*, **125**, 2579–2591.
- Majeti, R., Park, C.Y. & Weissman, I.L. (2007) Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. *Cell Stem Cell*, **1**, 635–645.
- Manz, M.G., Miyamoto, T., Akashi, K. & Weissman, I.L. (2002) Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 11872–11877.
- Matsuda, H., Coughlin, M.D., Bienenstock, J. & Denburg, J.A. (1988) Nerve growth factor promotes human hemopoietic colony growth and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**, 6508–6512.
- Mayado, A., Teodosio, C., Garcia-Montero, A.C., Matito, A., Rodriguez-Caballero, A., Morgado, J.M., Muñoz, C., Jara-Acevedo, M., Álvarez-Twose, I., Sanchez-Muñoz, L., Matarraz, S., Caldas, C., Muñoz-González, J.I., Escribano, L. & Orfao, A. (2016) Increased IL6 plasma levels in indolent systemic mastocytosis patients are associated with high risk of disease progression. *Leukemia*, **30**, 124–130.
- McKercher, S.R., Torbett, B.E., Anderson, K.L., Henkel, G.W., Vestal, D.J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A.J., Wu, G.E., Paige, C.J. & Maki, R.A. (1996) Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *The EMBO journal*, **15**, 5647–5658.
- Mehaffey, M.G., Newton, A.L., Gandhi, M.J., Crossley, M. & Drachman, J.G. (2001) X-linked thrombocytopenia caused by a novel mutation of GATA-1. *Blood*, **98**, 2681–2688.

- Méndez-Ferrer, S., Michurina, T.V., Ferraro, F., Mazloom, A.R., Macarthur, B.D., Lira, S.A., Scadden, D.T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G.N. & Frenette, P.S. (2010) Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*, **466**, 829–834.
- Mercher, T., Raffel, G.D., Moore, S.A., Cornejo, M.G., Baudry-Bluteau, D., Cagnard, N., Jesneck, J.L., Pikman, Y., Cullen, D., Williams, I.R., Akashi, K., Shigematsu, H., Bourquin, J.-P., Giovannini, M., Vainchenker, W., Levine, R.L., Lee, B.H., Bernard, O.A. & Gilliland, D.G. (2009) The OTT-MAL fusion oncogene activates RBPJ-mediated transcription and induces acute megakaryoblastic leukemia in a knockin mouse model. *The Journal of Clinical Investigation*, **119**, 852–864.
- Meyer, J., Rhein, M., Schiedlmeier, B., Kustikova, O., Rudolph, C., Kamino, K., Neumann, T., Yang, M., Wahlers, A., Fehse, B., Reuther, G.W., Schlegelberger, B., Ganser, A., Baum, C. & Li, Z. (2007) Remarkable leukemogenic potency and quality of a constitutively active neurotrophin receptor, deltaTrkA. *Leukemia*, **21**, 2171–2180.
- Milne, T.A., Briggs, S.D., Brock, H.W., Martin, M.E., Gibbs, D., Allis, C.D. & Hess, J.L. (2002) MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Molecular Cell*, **10**, 1107–1117.
- Molofsky, A.B., Savage, A.K. & Locksley, R.M. (2015) Interleukin-33 in Tissue Homeostasis, Injury, and Inflammation. *Immunity*, **42**, 1005–1019.
- Morrison, S.J. & Scadden, D.T. (2014) The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*, **505**, 327–334.
- Mrózek, K. (2008) Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype. *Seminars in Oncology*, **35**, 365–377.
- Mucenski, M.L., McLain, K., Kier, A.B., Swerdlow, S.H., Schreiner, C.M., Miller, T.A., Pietryga, D.W., Scott, W.J. & Potter, S.S. (1991) A functional c-myc gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell*, **65**, 677–689.
- Mukai, K., BenBarak, M.J., Tachibana, M., Nishida, K., Karasuyama, H., Taniuchi, I. & Galli, S.J. (2012) Critical role of P1-Runx1 in mouse basophil development. *Blood*, **120**, 76–85.
- Mulloy, J.C., Jankovic, V., Wunderlich, M., Delwel, R., Cammenga, J., Krejci, O., Zhao, H., Valk, P.J.M., Lowenberg, B. & Nimer, S.D. (2005) AML1-ETO fusion protein up-regulates TRKA mRNA expression in human CD34+ cells, allowing nerve growth factor-induced expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 4016–4021.
- Murati, A., Gervais, C., Carbuccia, N., Finetti, P., Cervera, N., Adélaïde, J., Struski, S., Lippert, E., Mugneret, F., Tigaud, I., Penther, D., Bastard, C., Poppe, B., Speleman, F., Baranger, L., Luquet, I., Cornillet-Lefebvre, P., Nadal, N., Nguyen-Khac, F., Pérot, C., et al (2009) Genome profiling of acute myelomonocytic leukemia: alteration of the MYB locus in MYST3-linked cases. *Leukemia*, **23**, 85–94.
- Naveiras, O., Nardi, V., Wenzel, P.L., Hauschka, P.V., Fahey, F. & Daley, G.Q. (2009) Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature*, **460**, 259–263.

- Nei, Y., Obata-Ninomiya, K., Tsutsui, H., Ishiwata, K., Miyasaka, M., Matsumoto, K., Nakae, S., Kanuka, H., Inase, N. & Karasuyama, H. (2013) GATA-1 regulates the generation and function of basophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 18620–18625.
- Nerlov, C., Querfurth, E., Kulesa, H. & Graf, T. (2000) GATA-1 interacts with the myeloid PU.1 transcription factor and represses PU.1-dependent transcription. *Blood*, **95**, 2543–2551.
- Nichols, K.E., Crispino, J.D., Poncz, M., White, J.G., Orkin, S.H., Maris, J.M. & Weiss, M.J. (2000) Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. *Nature Genetics*, **24**, 266–270.
- Ohmori, K., Luo, Y., Jia, Y., Nishida, J., Wang, Z., Bunting, K.D., Wang, D. & Huang, H. (2009) IL-3 induces basophil expansion in vivo by directing granulocyte-monocyte progenitors to differentiate into basophil lineage-restricted progenitors in the bone marrow and by increasing the number of basophil/mast cell progenitors in the spleen. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **182**, 2835–2841.
- O'Rourke, J.P. & Ness, S.A. (2008) Alternative RNA splicing produces multiple forms of c-Myb with unique transcriptional activities. *Molecular and Cellular Biology*, **28**, 2091–2101.
- Palmqvist, L., Pineault, N., Wasslavik, C. & Humphries, R.K. (2007) Candidate genes for expansion and transformation of hematopoietic stem cells by NUP98-HOX fusion genes. *PloS One*, **2**, e768.
- Pattabiraman, D.R. & Gonda, T.J. (2013) Role and potential for therapeutic targeting of MYB in leukemia. *Leukemia*, **27**, 269–277.
- Pattabiraman, D.R., McGirr, C., Shakhbazov, K., Barbier, V., Krishnan, K., Mukhopadhyay, P., Hawthorne, P., Trezise, A., Ding, J., Grimmond, S.M., Papathanasiou, P., Alexander, W.S., Perkins, A.C., Levesque, J.-P., Winkler, I.G. & Gonda, T.J. (2014) Interaction of c-Myb with p300 is required for the induction of acute myeloid leukemia (AML) by human AML oncogenes. *Blood*, **123**, 2682–2690.
- Pecaric-Petkovic, T., Didichenko, S.A., Kaempfer, S., Spiegl, N. & Dahinden, C.A. (2009) Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. *Blood*, **113**, 1526–1534.
- Persson, M., Andrén, Y., Mark, J., Horlings, H.M., Persson, F. & Stenman, G. (2009) Recurrent fusion of MYB and NFIB transcription factor genes in carcinomas of the breast and head and neck. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 18740–18744.
- Pevny, L., Lin, C.S., D'Agati, V., Simon, M.C., Orkin, S.H. & Costantini, F. (1995) Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development (Cambridge, England)*, **121**, 163–172.
- Pimanda, J.E., Ottersbach, K., Knezevic, K., Kinston, S., Chan, W.Y.I., Wilson, N.K., Landry, J.-R., Wood, A.D., Kolb-Kokocinski, A., Green, A.R., Tannahill, D., Lacaud, G., Kouskoff, V. & Göttgens, B. (2007) Gata2, Fli1, and Scl form a recursively wired gene-

- regulatory circuit during early hematopoietic development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 17692–17697.
- Ptasinska, A., Assi, S.A., Mannari, D., James, S.R., Williamson, D., Dunne, J., Hoogenkamp, M., Wu, M., Care, M., McNeill, H., Cauchy, P., Cullen, M., Tooze, R.M., Tenen, D.G., Young, B.D., Cockerill, P.N., Westhead, D.R., Heidenreich, O. & Bonifer, C. (2012) Depletion of RUNX1/ETO in t(8;21) AML cells leads to genome-wide changes in chromatin structure and transcription factor binding. *Leukemia*, **26**, 1829–1841.
- Qi, X., Hong, J., Chaves, L., Zhuang, Y., Chen, Y., Wang, D., Chabon, J., Graham, B., Ohmori, K., Li, Y. & Huang, H. (2013) Antagonistic regulation by the transcription factors C/EBP α and MITF specifies basophil and mast cell fates. *Immunity*, **39**, 97–110.
- Quelen, C., Lippert, E., Struski, S., Demur, C., Soler, G., Prade, N., Delabesse, E., Broccardo, C., Dastugue, N., Mahon, F.-X. & Brousset, P. (2011) Identification of a transforming MYB-GATA1 fusion gene in acute basophilic leukemia: a new entity in male infants. *Blood*, **117**, 5719–5722.
- Radomska, H.S., Bassères, D.S., Zheng, R., Zhang, P., Dayaram, T., Yamamoto, Y., Sternberg, D.W., Lokker, N., Giese, N.A., Bohlander, S.K., Schnittger, S., Delmotte, M.-H., Davis, R.J., Small, D., Hiddemann, W., Gilliland, D.G. & Tenen, D.G. (2006) Block of C/EBP alpha function by phosphorylation in acute myeloid leukemia with FLT3 activating mutations. *The Journal of Experimental Medicine*, **203**, 371–381.
- Ramsay, R.G., Ikeda, K., Rifkind, R.A. & Marks, P.A. (1986) Changes in gene expression associated with induced differentiation of erythroleukemia: protooncogenes, globin genes, and cell division. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **83**, 6849–6853.
- Rao, K.N., Smuda, C., Gregory, G.D., Min, B. & Brown, M.A. (2013) Ikaros limits basophil development by suppressing C/EBP- α expression. *Blood*, **122**, 2572–2581.
- Reddy, V.A., Iwama, A., Iotzova, G., Schulz, M., Elsasser, A., Vangala, R.K., Tenen, D.G., Hiddemann, W. & Behre, G. (2002) Granulocyte inducer C/EBP α inactivates the myeloid master regulator PU.1: possible role in lineage commitment decisions. *Blood*, **100**, 483–490.
- Rego, E.M., Wang, Z.G., Peruzzi, D., He, L.Z., Cordon-Cardo, C. & Pandolfi, P.P. (2001) Role of promyelocytic leukemia (PML) protein in tumor suppression. *The Journal of Experimental Medicine*, **193**, 521–529.
- Reuther, G.W., Lambert, Q.T., Caligiuri, M.A. & Der, C.J. (2000) Identification and characterization of an activating TrkA deletion mutation in acute myeloid leukemia. *Molecular and Cellular Biology*, **20**, 8655–8666.
- Rojas-Atencio, A., Urdaneta, K., Soto-Quintana, M., Alvarez Nava, F., Cañizales, J. & Solis, E. (2011) Trisomy 19 and t(9;22) in a patient with acute basophilic leukemia. *Case Reports in Pathology*, **2011**, 269491.
- Roumier, C., Fenaux, P., Lafage, M., Imbert, M., Eclache, V. & Preudhomme, C. (2003) New mechanisms of AML1 gene alteration in hematological malignancies. *Leukemia*, **17**, 9–16.

- Rusten, L.S., Jacobsen, S.E., Kaalhus, O., Veiby, O.P., Funderud, S. & Smeland, E.B. (1994) Functional differences between CD38- and DR- subfractions of CD34+ bone marrow cells. *Blood*, **84**, 1473–1481.
- Sakura, H., Kanei-Ishii, C., Nagase, T., Nakagoshi, H., Gonda, T.J. & Ishii, S. (1989) Delineation of three functional domains of the transcriptional activator encoded by the c-myb protooncogene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**, 5758–5762.
- Saluja, R., Ketelaar, M.E., Hawro, T., Church, M.K., Maurer, M. & Nawijn, M.C. (2015) The role of the IL-33/IL-1RL1 axis in mast cell and basophil activation in allergic disorders. *Molecular Immunology*, **63**, 80–85.
- Sandahl, J.D., Coenen, E.A., Forestier, E., Harbott, J., Johansson, B., Kerndrup, G., Adachi, S., Auvrignon, A., Beverloo, H.B., Cayuela, J.-M., Chilton, L., Fornerod, M., de Haas, V., Harrison, C.J., Inaba, H., Kaspers, G.J.L., Liang, D.-C., Locatelli, F., Masetti, R., Perot, C., et al (2014) t(6;9)(p22;q34)/DEK-NUP214-rearranged pediatric myeloid leukemia: an international study of 62 patients. *Haematologica*, **99**, 865–872.
- Sasaki, H., Kurotaki, D., Osato, N., Sato, H., Sasaki, I., Koizumi, S., Wang, H., Kaneda, C., Nishiyama, A., Kaisho, T., Aburatani, H., Morse, H.C., Ozato, K. & Tamura, T. (2015) Transcription factor IRF8 plays a critical role in the development of murine basophils and mast cells. *Blood*, **125**, 358–369.
- Sasaki, H., Kurotaki, D. & Tamura, T. (2016) Regulation of basophil and mast cell development by transcription factors. *Allergology International: Official Journal of the Japanese Society of Allergology*, **65**, 127–134.
- Schmidt-Arras, D., Böhmer, S.-A., Koch, S., Müller, J.P., Blei, L., Cornils, H., Bauer, R., Korasikha, S., Thiede, C. & Böhmer, F.-D. (2009) Anchoring of FLT3 in the endoplasmic reticulum alters signaling quality. *Blood*, **113**, 3568–3576.
- Schneider, E., Petit-Bertron, A.-F., Bricard, R., Levasseur, M., Ramadan, A., Girard, J.-P., Herbelin, A. & Dy, M. (2009) IL-33 activates unprimed murine basophils directly in vitro and induces their in vivo expansion indirectly by promoting hematopoietic growth factor production. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **183**, 3591–3597.
- Schneider, E., Thieblemont, N., De Moraes, M.L. & Dy, M. (2010) Basophils: new players in the cytokine network. *European Cytokine Network*, **21**, 142–153.
- Schofield, R. (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, **4**, 7–25.
- Servitzoglou, M., Grenzelia, M., Baka, M., Harisi, M., Pourtsidis, A., Bouhoutsou, D., Varvoutsis, M., Doganis, D., Dana, H., Divane, A. & Kosmidis, H. (2014) A novel karyotype in acute myeloid leukemia with basophilia. *Pediatric Hematology and Oncology*, **31**, 149–156.
- Shen, T., Kim, S., Do, J., Wang, L., Lantz, C., Urban, J.F., Le Gros, G. & Min, B. (2008) T cell-derived IL-3 plays key role in parasite infection-induced basophil production but is dispensable for in vivo basophil survival. *International Immunology*, **20**, 1201–1209.

- Shih, A.H., Abdel-Wahab, O., Patel, J.P. & Levine, R.L. (2012) The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nature Reviews. Cancer*, **12**, 599–612.
- Shih, L.-Y., Huang, C.-F., Wang, P.-N., Wu, J.-H., Lin, T.-L., Dunn, P. & Kuo, M.-C. (2004) Acquisition of FLT3 or N-ras mutations is frequently associated with progression of myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. *Leukemia*, **18**, 466–475.
- Shivdasani, R.A., Fujiwara, Y., McDevitt, M.A. & Orkin, S.H. (1997) A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *The EMBO journal*, **16**, 3965–3973.
- Shtivelman, E., Lifshitz, B., Gale, R.P. & Canaani, E. (1985) Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature*, **315**, 550–554.
- Shultz, L.D., Lyons, B.L., Burzenski, L.M., Gott, B., Chen, X., Chaleff, S., Kotb, M., Gillies, S.D., King, M., Mangada, J., Greiner, D.L. & Handgretinger, R. (2005) Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **174**, 6477–6489.
- Shvidel, L., Shaft, D., Stark, B., Shtalrid, M., Berrebi, A. & Resnitzky, P. (2003) Acute basophilic leukaemia: eight unsuspected new cases diagnosed by electron microscopy. *British Journal of Haematology*, **120**, 774–781.
- Sillaber, C., Geissler, K., Scherrer, R., Kaltenbrunner, R., Bettelheim, P., Lechner, K. & Valent, P. (1992) Type beta transforming growth factors promote interleukin-3 (IL-3)-dependent differentiation of human basophils but inhibit IL-3-dependent differentiation of human eosinophils. *Blood*, **80**, 634–641.
- Siracusa, M.C., Saenz, S.A., Hill, D.A., Kim, B.S., Headley, M.B., Doering, T.A., Wherry, E.J., Jessup, H.K., Siegel, L.A., Kambayashi, T., Dudek, E.C., Kubo, M., Cianferoni, A., Spergel, J.M., Ziegler, S.F., Comeau, M.R. & Artis, D. (2011) TSLP promotes interleukin-3-independent basophil haematopoiesis and type 2 inflammation. *Nature*, **477**, 229–233.
- Siracusa, M.C., Saenz, S.A., Wojno, E.D.T., Kim, B.S., Osborne, L.C., Ziegler, C.G., Benitez, A.J., Ruymann, K.R., Farber, D.L., Sleiman, P.M., Hakonarson, H., Cianferoni, A., Wang, M.-L., Spergel, J.M., Comeau, M.R. & Artis, D. (2013) Thymic stromal lymphopoietin-mediated extramedullary hematopoiesis promotes allergic inflammation. *Immunity*, **39**, 1158–1170.
- Smithgall, M.D., Comeau, M.R., Yoon, B.-R.P., Kaufman, D., Armitage, R. & Smith, D.E. (2008) IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *International Immunology*, **20**, 1019–1030.
- Smyth, G.K., Michaud, J. & Scott, H.S. (2005) Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **21**, 2067–2075.
- Somervaille, T.C.P., Matheny, C.J., Spencer, G.J., Iwasaki, M., Rinn, J.L., Witten, D.M., Chang, H.Y., Shurtleff, S.A., Downing, J.R. & Cleary, M.L. (2009) Hierarchical

- maintenance of MLL myeloid leukemia stem cells employs a transcriptional program shared with embryonic rather than adult stem cells. *Cell Stem Cell*, **4**, 129–140.
- Sramko, M., Markus, J., Kabát, J., Wolff, L. & Bies, J. (2006) Stress-induced inactivation of the c-Myb transcription factor through conjugation of SUMO-2/3 proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 40065–40075.
- Srour, E.F., Brandt, J.E., Briddell, R.A., Leemhuis, T., van Besien, K. & Hoffman, R. (1991) Human CD34+ HLA-DR- bone marrow cells contain progenitor cells capable of self-renewal, multilineage differentiation, and long-term in vitro hematopoiesis. *Blood Cells*, **17**, 287–295.
- Steinbach, D., Bader, P., Willasch, A., Bartholomae, S., Debatin, K.-M., Zimmermann, M., Creutzig, U., Reinhardt, D. & Gruhn, B. (2015) Prospective validation of a new method of monitoring minimal residual disease in childhood acute myelogenous leukemia. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, **21**, 1353–1359.
- Steinbach, D., Schramm, A., Eggert, A., Onda, M., Dawczynski, K., Rump, A., Pastan, I., Wittig, S., Pfaffendorf, N., Voigt, A., Zintl, F. & Gruhn, B. (2006) Identification of a set of seven genes for the monitoring of minimal residual disease in pediatric acute myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, **12**, 2434–2441.
- Suzukawa, M., Iikura, M., Koketsu, R., Nagase, H., Tamura, C., Komiya, A., Nakae, S., Matsushima, K., Ohta, K., Yamamoto, K. & Yamaguchi, M. (2008) An IL-1 cytokine member, IL-33, induces human basophil activation via its ST2 receptor. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **181**, 5981–5989.
- Takahashi, S., Onodera, K., Motohashi, H., Suwabe, N., Hayashi, N., Yanai, N., Nabesima, Y. & Yamamoto, M. (1997) Arrest in primitive erythroid cell development caused by promoter-specific disruption of the GATA-1 gene. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 12611–12615.
- Tanaka, Y., Patestos, N.P., Maekawa, T. & Ishii, S. (1999) B-myb is required for inner cell mass formation at an early stage of development. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, 28067–28070.
- Terui, K., Takahashi, Y., Kitazawa, J., Toki, T., Yokoyama, M. & Ito, E. (2000) Expression of transcription factors during megakaryocytic differentiation of CD34+ cells from human cord blood induced by thrombopoietin. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, **192**, 259–273.
- Thorén, L.A., Liuba, K., Bryder, D., Nygren, J.M., Jensen, C.T., Qian, H., Antonchuk, J. & Jacobsen, S.-E.W. (2008) Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **180**, 2045–2053.
- Till, J.E. & McCULLOCH, E.A. (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation Research*, **14**, 213–222.

- Tipping, A.J., Pina, C., Castor, A., Hong, D., Rodrigues, N.P., Lazzari, L., May, G.E., Jacobsen, S.E.W. & Enver, T. (2009) High GATA-2 expression inhibits human hematopoietic stem and progenitor cell function by effects on cell cycle. *Blood*, **113**, 2661–2672.
- Toki, T., Kanezaki, R., Kobayashi, E., Kaneko, H., Suzuki, M., Wang, R., Terui, K., Kanegane, H., Maeda, M., Endo, M., Mizuochi, T., Adachi, S., Hayashi, Y., Yamamoto, M., Shimizu, R. & Ito, E. (2013) Naturally occurring oncogenic GATA1 mutants with internal deletions in transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome. *Blood*, **121**, 3181–3184.
- Tsang, A.P., Visvader, J.E., Turner, C.A., Fujiwara, Y., Yu, C., Weiss, M.J., Crossley, M. & Orkin, S.H. (1997) FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell*, **90**, 109–119.
- Visnjic, D., Kalajzic, I., Gronowicz, G., Aguila, H.L., Clark, S.H., Lichtler, A.C. & Rowe, D.W. (2001) Conditional ablation of the osteoblast lineage in Col2.3deltatk transgenic mice. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, **16**, 2222–2231.
- Visnjic, D., Kalajzic, Z., Rowe, D.W., Katavic, V., Lorenzo, J. & Aguila, H.L. (2004) Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood*, **103**, 3258–3264.
- Voehringer, D. (2013) Protective and pathological roles of mast cells and basophils. *Nature Reviews. Immunology*, **13**, 362–375.
- Wang, Y., Gao, A., Zhao, H., Lu, P., Cheng, H., Dong, F., Gong, Y., Ma, S., Zheng, Y., Zhang, H., Zhang, Y., Xu, J., Zhu, X., Yuan, W., Zhang, X., Hao, S. & Cheng, T. (2016) Leukemia cell infiltration causes defective erythropoiesis partially through MIP-1 α /CCL3. *Leukemia*.
- Wechsler, J., Greene, M., McDevitt, M.A., Anastasi, J., Karp, J.E., Le Beau, M.M. & Crispino, J.D. (2002) Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nature Genetics*, **32**, 148–152.
- Welch, J.S., Ley, T.J., Link, D.C., Miller, C.A., Larson, D.E., Koboldt, D.C., Wartman, L.D., Lamprecht, T.L., Liu, F., Xia, J., Kandoth, C., Fulton, R.S., McLellan, M.D., Dooling, D.J., Wallis, J.W., Chen, K., Harris, C.C., Schmidt, H.K., Kalicki-Veizer, J.M., Lu, C., et al (2012) The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell*, **150**, 264–278.
- Wick, M.R., Li, C.Y. & Pierre, R.V. (1982) Acute nonlymphocytic leukemia with basophilic differentiation. *Blood*, **60**, 38–45.
- Wiemels, J.L., Xiao, Z., Buffler, P.A., Maia, A.T., Ma, X., Dicks, B.M., Smith, M.T., Zhang, L., Feusner, J., Wiencke, J., Pritchard-Jones, K., Kempinski, H. & Greaves, M. (2002) In utero origin of t(8;21) AML1-ETO translocations in childhood acute myeloid leukemia. *Blood*, **99**, 3801–3805.

- Wierenga, A.T.J., Vellenga, E. & Schuringa, J.J. (2010) Down-regulation of GATA1 uncouples STAT5-induced erythroid differentiation from stem/progenitor cell proliferation. *Blood*, **115**, 4367–4376.
- Winkler, I.G., Sims, N.A., Pettit, A.R., Barbier, V., Nowlan, B., Helwani, F., Poulton, I.J., van Rooijen, N., Alexander, K.A., Raggatt, L.J. & Lévesque, J.-P. (2010) Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood*, **116**, 4815–4828.
- Winn, L.M., Lei, W. & Ness, S.A. (2003) Pim-1 phosphorylates the DNA binding domain of c-Myb. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, **2**, 258–262.
- Yan, H., Bigner, D.D., Velculescu, V. & Parsons, D.W. (2009) Mutant metabolic enzymes are at the origin of gliomas. *Cancer Research*, **69**, 9157–9159.
- Yan, X.-J., Xu, J., Gu, Z.-H., Pan, C.-M., Lu, G., Shen, Y., Shi, J.-Y., Zhu, Y.-M., Tang, L., Zhang, X.-W., Liang, W.-X., Mi, J.-Q., Song, H.-D., Li, K.-Q., Chen, Z. & Chen, S.-J. (2011) Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nature Genetics*, **43**, 309–315.
- Yoshida, K., Toki, T., Okuno, Y., Kanazaki, R., Shiraishi, Y., Sato-Otsubo, A., Sanada, M., Park, M., Terui, K., Suzuki, H., Kon, A., Nagata, Y., Sato, Y., Wang, R., Shiba, N., Chiba, K., Tanaka, H., Hama, A., Muramatsu, H., Hasegawa, D., et al (2013) The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. *Nature Genetics*, **45**, 1293–1299.
- Yu, C., Cantor, A.B., Yang, H., Browne, C., Wells, R.A., Fujiwara, Y. & Orkin, S.H. (2002) Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, **195**, 1387–1395.
- Yu, M., Riva, L., Xie, H., Schindler, Y., Moran, T.B., Cheng, Y., Yu, D., Hardison, R., Weiss, M.J., Orkin, S.H., Bernstein, B.E., Fraenkel, E. & Cantor, A.B. (2009) Insights into GATA-1-mediated gene activation versus repression via genome-wide chromatin occupancy analysis. *Molecular Cell*, **36**, 682–695.
- Zhang, D.E., Zhang, P., Wang, N.D., Hetherington, C.J., Darlington, G.J. & Tenen, D.G. (1997) Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 569–574.
- Zhang, J., Jin, Z., Du, Q., Li, R., Yao, F., Huang, B., Xu, N., Xu, L., Luo, X. & Liu, X. (2012) Analysis of altered proteins related to blast crisis in chronic myeloid leukemia by proteomic study. *International Journal of Laboratory Hematology*, **34**, 267–273.
- Zhang, X., Li, X., Li, X., Zheng, L. & Lei, L. (2015) ANXA1 silencing increases the sensitivity of cancer cells to low-concentration arsenic trioxide treatment by inhibiting ERK MAPK activation. *Tumori*, **101**, 360–367.
- Zhao, L., Glazov, E.A., Pattabiraman, D.R., Al-Owaidi, F., Zhang, P., Brown, M.A., Leo, P.J. & Gonda, T.J. (2011) Integrated genome-wide chromatin occupancy and expression

analyses identify key myeloid pro-differentiation transcription factors repressed by Myb. *Nucleic Acids Research*, **39**, 4664–4679.

Zheng, X., Karsan, A., Duronio, V., Chu, F., Walker, D.C., Bai, T.R. & Schellenberg, R.R. (2002) Interleukin-3, but not granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5, inhibits apoptosis of human basophils through phosphatidylinositol 3-kinase: requirement of NF-kappaB-dependent and -independent pathways. *Immunology*, **107**, 306–315.

Zhu, F., Wang, Y., Zeng, S., Fu, X., Wang, L. & Cao, J. (2009) Involvement of annexin A1 in multidrug resistance of K562/ADR cells identified by the proteomic study. *OmicS: A Journal of Integrative Biology*, **13**, 467–476.

Zuber, J., Rappaport, A.R., Luo, W., Wang, E., Chen, C., Vaseva, A.V., Shi, J., Weissmueller, S., Fellmann, C., Fellman, C., Taylor, M.J., Weissenboeck, M., Graeber, T.G., Kogan, S.C., Vakoc, C.R. & Lowe, S.W. (2011) An integrated approach to dissecting oncogene addiction implicates a Myb-coordinated self-renewal program as essential for leukemia maintenance. *Genes & Development*, **25**, 1628–1640.