Identification de microARN impliqués dans la leucémogenèse

Anne-Sophie Espadinha

▶ **To cite this version:**

Anne-Sophie Espadinha. Identification de microARN impliqués dans la leucémogenèse. Cancer. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0437 . tel-01542500

HAL Id: tel-01542500
https://theses.hal.science/tel-01542500

Submitted on 19 Jun 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.

Thèse pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Identification de microARN impliqués dans la leucémogenèse

Soutenue le 16 décembre 2016

Par Anne-Sophie ESPADINHA
Née le 22 Août 1989 à Bordeaux (33)

Membres du jury

Pr. François Moreau-Gaudry	Université de Bordeaux	Président du jury
Pr. Eric Lippert	Université de Brest	Rapporteur
Dr. Roger Rezzonico	Université de Nice Sophia Antipolis	Rapporteur
Pr. François-Xavier Mahon	Université de Bordeaux	Examinateur
Dr. Stéphanie Salesse	Université de Reims-Champagne-Ardenne	Examinatrice
Dr. Cathy Staedel	Université de Bordeaux	Invitée
Dr. Bruno Cardinaud	Bordeaux INP	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier le Professeur François-Xavier Mahon de m'avoir accueilli dans son équipe dès mon master 2 et de m'avoir permis de poursuivre mon chemin en thèse. Merci pour vos conseils, votre soutien et votre écoute lorsque cela a été nécessaire.

Je remercie également Bruno Cardinaud qui a d'abord été mon maître de stage puis mon directeur de thèse. Merci pour votre accompagnement, votre disponibilité et votre exigence qui m'ont permis de grandir et de prendre confiance en moi.

Je remercie Stéphanie Salesse, Roger Rezzonico et le Professeur Eric Lippert pour leur compréhension et pour avoir pris le temps de me conseiller afin d'améliorer ce manuscrit.

Je remercie le Professeur François Moreau-Gaudry d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. Merci également pour vos conseils tout au long de ce parcours.

Je remercie l'ensemble des plateformes sans qui ce travail n'aurait pas été possible. Merci sincèrement à Alice et Véronique pour leur expertise et pour avoir toujours fait de leur mieux pour répondre à mes demandes tardives. Merci également à Santiago et Vincent pour leur savoir, leur bonne humeur et leur compréhension tout au long de ce travail.

Je remercie également toutes les personnes qui se sont rendues disponibles pour m'aider à avancer au cours de cette thèse. Merci ainsi à Philippe Brunet de la Grange pour son investissement dans ce projet que j'aurai réellement souhaité amené plus loin si le temps ne m'avait pas manqué.

Je remercie sincèrement toutes les personnes de mon équipe qui m'ont accompagné tout au long de mon master 2, lors du passage de mon concours et au cours de cette thèse. Parmi elles, je remercie tout particulièrement Valérie PM, Valérie L, Béatrice et Jean-Max (et Eric à nouveau) pour leurs précieux conseils et leur aide bienveillante à chaque fois que j'en ai eu besoin. Je n'oublie pas Amine, Matthieu et Florence, merci pour votre bonne humeur et votre gentillesse !

Merci également à l'ensemble des membres du laboratoire pour leur accueil. Merci particulièrement à Lucie, qui m'a toujours impressionné par son génie et sa simplicité à la fois. Merci d'avoir été là.

Je n'oublie évidemment pas mes colocataires de bureaux, Stéphane, Pierre-Yves et Olivier. Mon wawa féministe va vous manquer j'en suis sûre ! Plus sérieusement, j'ai été très heureuse de partager tous ces moments avec vous. Merci pour vos conseils et pour les fous rires que vous m'avez donné.

Merci aux Bergo : Simon, Ben, Kelly et tous les autres pour leur bonne humeur et la solidarité qui nous a lié pendant chaque congrés… Je remercie tout particulièrement Gwenola, notre thésard-sitter qui a largement contribué à cette cohésion. Simon, j'ai été ravie de partager ces quelques TP avec toi, malgrés nos couacs de mails avec les étudiants !

Je remercie également toutes les personnes qui m'ont accompagné et permis de me découvrir dans le domaine de l'enseignement. Merci à Thomas Ducret et Etienne Roux pour leur confiance et

pour m'avoir donné la chance de découvrir autrement la filière universitaire. Je me suis sincèrement épanoui à donner ces cours. Merci également à Marine et Damien pour leur bonne humeur et surtout pour m'avoir initié aux joies de la préparation des TP sur animaux… Je ne l'oublierai pas, c'est certain !

A mon groupe d'amis de l'université, le Master Soirée (marque déposée !). Merci d'être vous depuis cinq ans ou plus pour certains ! Il y a tellement de souvenirs qui lient ce groupe … Merci sincèrement pour les bulles d'oxygène que vous m'avez apporté. Je remercie d'abord particulièrement Magali, mon petit bonhomme, mon petit acra de morue… Les emplois du temps n'ont pas été simples et tu m'as beaucoup manqué pendant cette thèse, mais tu as quand même toujours être là lorsque j'en avais besoin et pour cela merci ! Merci également à Antonin, pour qui cette année a été un véritable enchainement de pur bonheur. Je suis fière de tout ce que tu entreprends et je te remercie pour ton écoute et ton soutien permanent. Merci aussi à Bruno, même si tu es loin de moi tu restes quand même l'un de mes préférés !

Merci aux personnes qui m'ont accompagné à certaines périodes critiques de cette thèse et qui se reconnaitront. Merci également à celles qui sont apparues récemment dans ma vie et qui m'ont largement soutenu ces derniers mois. Je pense notamment à Mike et Margot, les plus choux ! Merci pour votre bonne humeur et de m'avoir gâté en fleurs ! Merci aussi à mon petit Pierrot l'artiste, mon double démoniaque, pour toutes ces folles soirées bordelaises.

Je remercie également mes amis les plus proches, ceux qui me connaissent depuis toujours ou presque. Bastien, Denis et Lorry et leur fameux Mibu Pentahouse. Votre soutien ne m'a pas toujours rendu productive le week-end… Mais je profite de ces remerciements pour vous dire à quel point je suis heureuse de voir que depuis le collège rien ne change et c'est tellement bien ainsi. Merci aussi à Tiouf, qui ne m'a jamais tenu rigueur de nos rendez-vous Skype manqués par soucis d'emploi du temps … Quelle idée de nous avoir abandonnés pour l'hémisphère Sud aussi !

Merci infiniment à Noémie. Ma plus belle rencontre de cette dernière année. Merci pour ton sourire, ta gentillesse, ton écoute, ta folie, ton pep's… Bref toutes ces qualités qui font de toi une fille formidable et qui te rend aujourd'hui indispensable à mon quotidien.

Je remercie également tout particulièrement les parents de mon amoureux, Béatrice et Jean-Fred, de m'avoir accueilli aussi chaleureusement dans leur famille. Merci sincèrement pour votre soutien et votre confiance.

A mes parents, qui m'ont soutenu et supporté durant ce long parcours et qui ont fait tout leur possible pour m'aider à réaliser ce grand projet. La famille constitue une base solide et je sais que je pourrai toujours compter sur vous quelles que soit mes décisions. Merci pour votre amour infini, même dans les moments difficiles.

Enfin, je remercie mon Félix pour sa présence et son soutien sans faille. Merci d'avoir été là dans cette dernière ligne droite (qui n'a pas toujours été facile à supporter...). Je ne te serai jamais assez reconnaissante pour toute l'aide précieuse et pour tout le bonheur que tu m'apportes un peu plus chaque jour.

RESUME

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une hémopathie maligne causée par l'apparition du chromosome *Philadelphie* dans la cellule souche hématopoïétique (CSH), conduisant à l'expression de la protéine de fusion BCR-ABL1. L'activité tyrosine kinase dérégulée de cette oncoprotéine provoque l'activation de plusieurs voies de signalisation critiques dans la leucémogenèse. Si les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) ciblant BCR-ABL1 représentent des traitements dans l'ensemble très efficaces, plusieurs études montrent que les cellules leucémiques les plus immatures de la moelle osseuse y sont insensibles.

Cette thèse propose de compléter les connaissances relatives aux effets de BCR-ABL1 dans la cellule, et plus généralement aux propriétés des CSH de LMC. Notre intérêt s'est focalisé sur le rôle potentiel des microARN.

Dans un premier travail, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'activité BCR-ABL1 sur le protéome et sur l'expression des microARN dans la lignée cellulaire K562. Les résultats montrent que BCR-ABL1 régule l'expression d'un microARN fréquemment surexprimé dans les cancers, miR-21. Cet effet dépend du facteur de transcription STAT5, cible bien connue de l'activité kinase de BCR-ABL1.

Dans une seconde partie, nous avons montré que dans la moelle osseuse des patients LMC, la fraction cellulaire enrichie en cellules souches (les cellules $CD34^{+}CD38^{low}$) exprime quatre microARN particuliers: mir-10a, mir-150, miR-155 et miR-146a. Deux de ces microARN (miR-150 et miR-155) sont trouvés spécifiquement dans les cellules des patients, et pas dans celles des individus sains.

SOMMAIRE

INTRODUCTION 16
Chapitre 1 : Les microARN 17
I. Biogenèse des microARN 18
1. Transcription des microARN 18
a. Organisation génique 18
b. Les ARN polymérases 19
c. La notion de cluster 19
2. Maturation des transcrits des microARN 20
a. Maturation nucléaire 20
b. Export des précurseurs du noyau vers le cytoplasme 20
c. Maturation cytoplasmique 21
d. Cas des microARN à la biogenèse non-canonique 22
II. Mécanismes d'action 23
1. Détermination des ARNm cibles des microARN 23
a. Principe du seed 23
b. Caractérisation de la cible d'un microARN 25
2. Mécanismes de répression de l'expression génique 26
a. Acteurs et localisation du processus de la répression traductionnelle 27
b. Inhibition de la traduction 27
c. Dégradation des ARNm 28
III. MicroARN et cancers 29
1. Dérégulation de l'expression des microARN 29
a. Anormalités chromosomiques 29
b. Régulation transcriptionnelle 30
c. Défaut dans la biogenèse des microARN 30
d. Modulations épigénétiques 31
2. MicroARN oncogéniques et suppresseurs de tumeurs reconnus 32
a. OncomicroARN reconnus 32
b. MicroARN suppresseurs de tumeurs reconnus 35
c. MicroARN oncogéniques ou suppresseurs de tumeur en fonction du contexte 36
3. Utilisation potentielle des microARN comme biomarqueurs de diagnostic et de suivi thérapeutique 36

Chapitre 2 : La cellule souche hématopoiétique et l'hématopoièse 39
I. L'hématopoïèse 40
II. Méthodes d'étude de la CSH 40
1. Caractérisation fonctionnelle de la CSH 41
a. Etudes in vitro 42
b. Tests in vivo 43
2. Marqueurs cellulaires de la CSH 43
a. Marqueurs de surface 43
b. Marquage intra-cellulaire 44
3. Les modèles murins 45
4. Source des CSH 46
III. Régulation de l'hématopoïèse 46

1. Le Microenvironnement médullaire 47
a. Les niches endostéales et sinusoidales 47
b. Voies de signalisations régulatrice de l'autorenouvellement et de la quiescence 48
2. Régulateurs intrinsèques et extrinsèques de l'hématopoïèse 49
IV. Implication des microARN dans la régulation de l'hématopoïèse 50
1. Les microARN dans le maintien des propriétés de la CSH 51
2. Les microARN régulateurs du microenvironnement médullaire 52
3. Le role des microARN dans la differenciation hématopoiétique 52

Chapitre 3 : La leucémie myéloïde chronique, un modèle d'étude de la cellule souche cancéreuse 54
I. La leucémie myéloïde chronique (LMC) 55
1. Généralités 55
2. Phases d'évolutions de la maladie 55
3. BCR-ABL1, la protéine de fusion centrale dans la LMC 56
II. Effets de l'expression de la protéine BCR-ABL1 58
1. Activation des voies oncogéniques par BCR-ABL1 58
a. Les voies STATs 58
b. La voie RAS/MEK/ERK 59
c. La voie PI3K/AKT 59
d. Régulation des oncogènes et suppresseurs de tumeurs p53 et c-myc par BCR-ABL1 60
e. Inactivation des protéines inhibitrices de BCR-ABL1 60
2. Modification des propriétés cellulaires 61
a. .Suppression de la réponse apoptotique 61
b. Altération du recrutement et de l'adhésion des CSH-LMC 61
c. Quiesence et autorenouvellement 62
3. Marqueurs de surface spécifiques 63
III. Implication des microARN dans la leucémogenèse 64
1. Les microARN surexprimés dans la LMC 64
2. Les microARN sous-exprimés dans la LMC 65
IV. Traitements de la LMC 66
1. Traitements cliniques de la LMC 66
a. Traitements avant la découverte des ITK 66
b. Générations d'ITK 68
c. Nouvelles thérapies en étude 68
2. Mécanismes de résistances aux traitements 68
a. Résistances dépendantes de BCR-ABL1 69
b. Résistances BCR-ABL1 indépendantes 69
3. La persistance des CSH-LMC chez les patients traités aux ITK 71

Conclusion 72

RESULTATS 73

PROJET 1: Rôle de l'axe BCR-ABL1/STAT5/miR-21/PDCD4 dans la LMC 74
I. Objectif et remise en contexte 75
II. Article 77
III. Discussion 111

1. Mise en évidence de l'intermédiaire de régulation entre BCR-ABL1 et miR-21 111
a. Généralités sur la régulation de miR-21 112
b. Les facteurs STATs 114
c. Détermination de STAT5 comme élément moteur de la régulation de miR-21 114
2. Analyse fonctionnelle de miR-21 115
a. miR-21, un exemple d'oncomicroARN 115
b. miR-21, un effecteur de STAT5 116
c. Identification de PDCD4 comme cible de miR-21 dans la LMC 117
3. Etudes complémentaires et perspectives 118
a. La régulation de la forme minoritaire miR-21* 118
b. Une double régulation de PDCD4 119
c. Modèles d'études complémentaires : les autres lignées 119
d. La limite de la manipulation des $CD34^+$ de patients LMC 120
4. Synthèse 121

PROJET 2 : Identification d'un profil microARN spécifique des cellules souches LMC 122
I. OBJECTIFS 123
II. Matériels et méthodes 125
1. Méta-analyse de données de transcriptomes de cellules $CD34^+CD38^{low}$ et $CD34^+CD38^+$ 125
2. Sources cellulaires 125
3. Préparation des cellules mononuclées 126
4. Tri des populations $CD34^+CD38^{+/low}$ 126
5. Extraction des ARN 127
6. Analyse *microarray* 128
7. Quantification de l'expression des microARN et des ARNm par RT-PCR quantitative 129
8. Analyse statistique 129
III. Résultats 130
1. Contrôle qualité des échantillons $CD34^+CD38^{low}$ purifiés 130
2. Comparaison du profil d'expression des microARN des sous-populations CSPH et progéniteurs/précurseurs de LMC 132
a. Un profil et une population différente 132
b. Des microARN différentiellement exprimés entre les deux sous-populations 132
c. Confirmation par miRT-qPCR 134
3. Expression des microARN miR-10a, miR-150, miR-155 et miR-146a dans les fractions CSPH ($CD34^+CD38^{low}$) normales. 135
a. Quantification de miR-10a, miR-150, miR-155 et miR-146a dans les sangs de cordons 135
b. Comparaison des populations CD34+CD38low normales et LMC 135
IV. Discussion et perspectives 136
1. Lien entre les microARN identifiés, CSH et BCR-ABL1 136
a. miR-146a 136
b. miR-10a 137
c. miR-150 137
d. miR-155 138

2. Perspectives 139
a. Etudes fonctionnelles in vivo 140
b. Etudes fonctionnelles in vitro 141

Bibliographie 142

LISTE DES ABREVIATIONS

3‘UTR	3‘untranslated
5‘UTR	5‘untranslated
5-FU	5-Fluoro-Uracile
ABCB1	ATP binding cassette subfamily B -1
ABL1	Abelson1
ADN	Acide Déoxyribonucléique
Ago	Argonaute
ALDH	Aldehyde dehydrogenase
Angptl-3	Angiopoietin like 3
AP-1	Activator protein-1
APC-Cy7	Allophycocyanin – Cyanine 7
ARN	Acide ribonucléique
ARN pol II	ARN polymérase de type 2
ARN pol III	ARN polymérase de type III
ARNm	ARN messager
ATP	Adénine Triphosphate
BCL2	B-cell lymphoma 2
BCLxL	B-cell lymphoma-extra large
BCR	Breakpoint cluster region
BFU	Burst-forming units
BMP4	Bone marrow protein 4
BSA	Bovin serum albumin
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding protein
CAF-1	Chromatin assembly factor -1
CB	Crise blastique
CD	Clustered
CDS	Coding sequence
CFC	Colony forming cells
CFU	Colony forming units
CFU-S	Colony forming units in spleen
CO2	Dioxyde de carbone
CRHBP	Corticotropin Releasing Hormone Binding Protein
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CSH	Cellule souche hématopoïétique
CSH-LMC	Cellule souche hématopoïétique de leucémie myéloïde chronique
CSL	Cellule souche leucémique
CSPH	Cellule souche et progéniteur hématopoïétique
Ct	Threshold cycle
CXCL	Chemiokine ligand
CXCR	Chemiokine receptor
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DCP2	mRNA-decapping enzyme 2
DGCR8	DiGeorge syndrome chromosomal/critical region 8
DNMT	ADN méthyltransférase
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
eIF	Eukaryotic initation factor
FLT3-ITD	Fms-like tyrosine kinase 3 – internal tandem duplication

Fz	Frizzled
GAB2	GRB2-associated binding protein
GAS2	Growth arrest specific 2
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony – stimulation factor
GMP	granulocyte-macrophage progenitor
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
HDC	Histidine decarboxylase
HITS-CLIP	High-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation
HLA	human leukocyte antigen
HLF	Hepatic leukemia factor
hOCT1	Human organic cation transporter 1
IFNα	Interferon α
IL1R1	Interleukin-1 receptor typ I
IL1RAP	Interleukin-1 receptor accessory protein
IL-6	Interleukin 6
iPSC	Induced pluiripotent stem cells
IRAK1	Interleukin 1 receptor associated kinase 1
IRF8	Interferon regulatory factor 8
ITK	Inhibiteur de tyrosine kinase
JAK	Janus kinase
KD	Knock-down
KO	Knock-out
LAM	Leucémie aigüe myéloblastique
LMC	Leucémie myéloïde chronique
LNA	Locked Nucleic Acid
LOH	Loss of heterozygosity
LSK	Lin^{-} $Sca1^{+}$ Kit
LT-CSH	Long-term CSH
m7G	7‘méthylguanosine
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MDR1	Multidrug resistance protein 1
MEP	Megakaryocyte–erythroid progenitor
miR	microARN
miRISC	microRNA-induced silencing complex
miRT	microRNA reverse transcription
NGS	Next-generation sequencing
NK	Natural killer
PA	Phase d‘accélération
PABP	Poly-adenylation-binding protein
PBS	Phosphate-buffered saline
PC	Phase chronique
PCRq	Polymerase chain reaction quantitative
PDCD4	Programmed Cell Death 4
PDGFR	Platelet-derived growth factor
PE	Phycoerythrin
PEB	PBS-EDTA-BSA
Ph+	Cellules Philadelphie positives
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase

PP2A	Protein Phosphatase 2A
PTEN	Phosphatase And Tensin Homolog
RAN-GDP	RAs-related Nuclear protein- guanosine triphosphate
RAN-GTP	RAs-related Nuclear protein- guanosine diphosphate
RISC	RNA induced silencing complex
RT	Reverse transcription
sHh	Sonic Hedgehog
STAT	Signal transducer and activator of transcription
ST-CSH	Short-term CSH
TGFβ	transforming growth factor β
TRAF6	TNF receptor associated factor 6
TRBP	TAR RNA binding protein
Ua	Unité arbitraire
XRN1	5'-3' exoribonuclease 1

INDEX DES FIGURES

Figure 1. Organisation génique des microARN. p.18
Figure 2. Représentation schématique des pri-miRNA monocistroniques et polycistroniques. p.19
Figure 3. Représentation schématique de la biogenèse des microARN. p.20
Figure 4. La formation du complexe RISC. p.21
Figure 5. Représentation schématique des interactions microARN-ARNm canoniques et non-canoniques. p.24
Figure 6. Modèle de mécanisme d'action des microARN. p.27
Figure 7. Schéma des différentes étapes de l'hématopoïèse. p.40
Figure 8. Représentation schématique des marqueurs de surface propres aux cellules hématopoïétiques humaines et murines. p.43
Figure 9. Le microenvironnement médullaire et le fonctionnement des niches hématopoiétiques. p.47
Figure 10. Récapitulatif des différentes voies de signalisations régulatrices de l'autorenouvellement et de la quiescence des CSH. p.48
Figure 11. Facteurs de régulations extrinsèques et intrinsèques de l'hématopoïèse. p.50
Figure 12. La protéine de fusion BCR-ABL1. p.56
Figure 13. Résumé des voies de signalisation activées par BCR-ABL1. p.58
Figure 14. Expression et activation différentielle des facteurs STAT3 et STAT5 dans les cellules K562. p.115
Figure 15. Effet du *knock-down* de miR-21 et de STAT5 sur la prolifération et la sensibilité des cellules K562 à l'imatinib. p.117
Figure 16. Effet du traitement par l'imatinib sur l'expression de miR-21 et miR-21* dans la lignée K562. p.118
Figure 17. Effet du traitement par l'imatinib et du *knock-down* de miR-21 sur l'expression de PDCD4 comparé au *knock-down* de miR-21. p.119
Figure 18. Régulation de l'expression de miR-21, de PDCD4, de l'activité du promoteur de miR-21 et de la phosphorylation de STAT5 par un ITK dans deux lignées de LMC et deux lignées de LAM. p.120
Figure 19 : Schéma général du mécanisme de régulation entre BCR-ABL1 ou FLT3-ITD, miR-21 et PDCD4 proposé par notre étude. p.121
Figure 20. Tri par cytométrie de flux des populations $CD34^+CD38^{low}$ et $CD34^+CD38^+$ de LMC. p.127
Figure 21 : Résultats de la méta-analyse des études transcriptomiques *Gerber et al.* et *Valent et al.*. p.131
Figure 22. Quantification par RT-qPCR de sept ARNm dans les préparations de cellules $CD34^+CD38^{low}$ et $CD34^+CD38^+$ de quatre patients LMC. p.131
Figure 23. Classification hiérarchique des préparations de cellules $CD34^+CD38^{low}$ et $CD34^+CD38^+$ de quatre patients LMC sur la base de leur profil d'expression des microARN. p.132
Figure 24. *Heatmap* du profil d'expression des microARN différentiellement exprimés entre les échantillons $CD34^+CD38^{low}$ et $CD34^+CD38$ p.133
Figure 25. Scatter plot de l'expression des microARN dans les deux échantillons $CD34^+CD38^{low}$ et $CD34^+CD38^+$. p.133
Figure 26. *Volcanoplot* de l'expression des microARN dans les deux échantillons $CD34^+CD38^{low}$ et $CD34^+CD38^+$. p.133

Figure 27. Expression de quatre microARN d'intérêt dans les deux échantillons $CD34^{+}CD38^{low}$ et $CD34^{+}CD38^{+}$. p.133
Figure 28. Confirmation par miRT-qPCR des résultats de l'analyse *microarray*. p.134
Figure 29. Confirmation de l'enrichissement des microARN candidat dans les CSPH de moelles osseuses de patients LMC au diagnostic. p.134
Figure 30. Quantification des microARN d'intérêt dans les CSPH d'individus sains (sangs de cordons). p.135
Figure 31. Comparaison de l'expression des quatre microARN d'intérêt dans les CSPH de sangs de cordons, les cytaphérèses et les moelles osseuses de patients LMC au diagnostic. p.136
Figure 32. Schéma général de l'expression des microARN entre les fractions CSPH et progéniteurs/précurseurs de LMC et sains. p.139

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1. Récapitulatif des spécificités propres à chaque logiciel bioinformatique. p.25
Tableau 2. Récapitulatif des microARN potentiellement biomarqueurs de cancers. p.37
Tableau 3. Récapitulatif des différents types de cellules souches. p.39
Tableau 4. Récapitulatif des paramètres d'évolution de la LMC. p.56
Tableau 5. Spécificité des inhibiteurs de tyrosines kinases. p.68
Tableau 6. Oligonucléotides utilisés pour les PCR quantitatives. p.129
Table 7. Liste des microARN différentiellement exprimés ($p<0.01$) entre les échantillons CD34+CD38low et CD34+CD38+ de quatre patients LMC. p.130

AVANT-PROPOS

Cette thèse s'est focalisée sur l'identification de microARN potentiellement impliqués dans la leucemogenèse.

Ce manuscrit reprend donc dans une première partie introductive le contexte littéeraire associé à la place des microARN dans le cancer, l'hematopoïèse et la pathologie d'intérêt, la leucémie myéloïde chronique.

La seconde partie faisant suite à l'introduction présente les resultats des deux projets conduits au cours de ce doctorat. Le contexte et la problématique de chaque projet sont décrits avant d'exposer les résultats. Les données obtenues au cours de ce doctorat sont enfin commentées et discutées de façon plus approfondit.

INTRODUCTION

Chapitre 1

Les microARN

Les microARN sont de petits ARN non-codants d'une vingtaine de nucléotides essentiels à la régulation de l'expression des protéines. Le premier micro-ARN découvert est lin-4 dont le rôle dans la transition larvaire du nématode *C.elegans* est décrit par l'équipe d'Ambros en 1993[1]. Jusqu'aux années 2000, lin-4 reste un exemple isolé compte tenu du fait qu'aucune séquence comparable n'ait été décrite dans d'autres espèces. L'équipe de Reinhart découvre alors un deuxième microARN, let-7, également impliqué dans la régulation du développement du nématode (Reinhardt et al., 2000). Cette étude précise le mécanisme d'action potentiel et fonctionnel d'un microARN *via* la mise en évidence de la fixation de let-7 sur la région 3' non-codante de l'ARN messager (ARNm) de LIN-41. Les années 2000 marquent un tournant dans l'intérêt d'étudier et de mieux caractériser ces microARN lorsque l'étude de Pasquinelli montre que la séquence et les cibles de let-7 sont conservées entre les vertébrés et les invertébrés[2]. Les nombreux travaux qui ont suivi ont ainsi permis de mieux décrire l'organisation génique ainsi que les modalités de régulation et d'expression propres aux microARN dans le contexte physiologique, mais aussi dans différentes conditions pathologiques comme le cancer.

Vingt-trois ans après la découverte de lin-4 chez *C.elegans*, plus de 2600 séquences de microARN sont référencées chez l'homme[3]. De nombreuses questions restent encore d'actualité compte tenu de la complexité du mécanisme d'action des microARN et de la diversité des processus de régulation de leur expression. Ce chapitre présentera un résumé de l'état des connaissances actuelles relatives à la biogenèse, aux mécanismes d'action et aux liens supposés des microARN avec la physiopathologie et plus particulièrement le cancer.

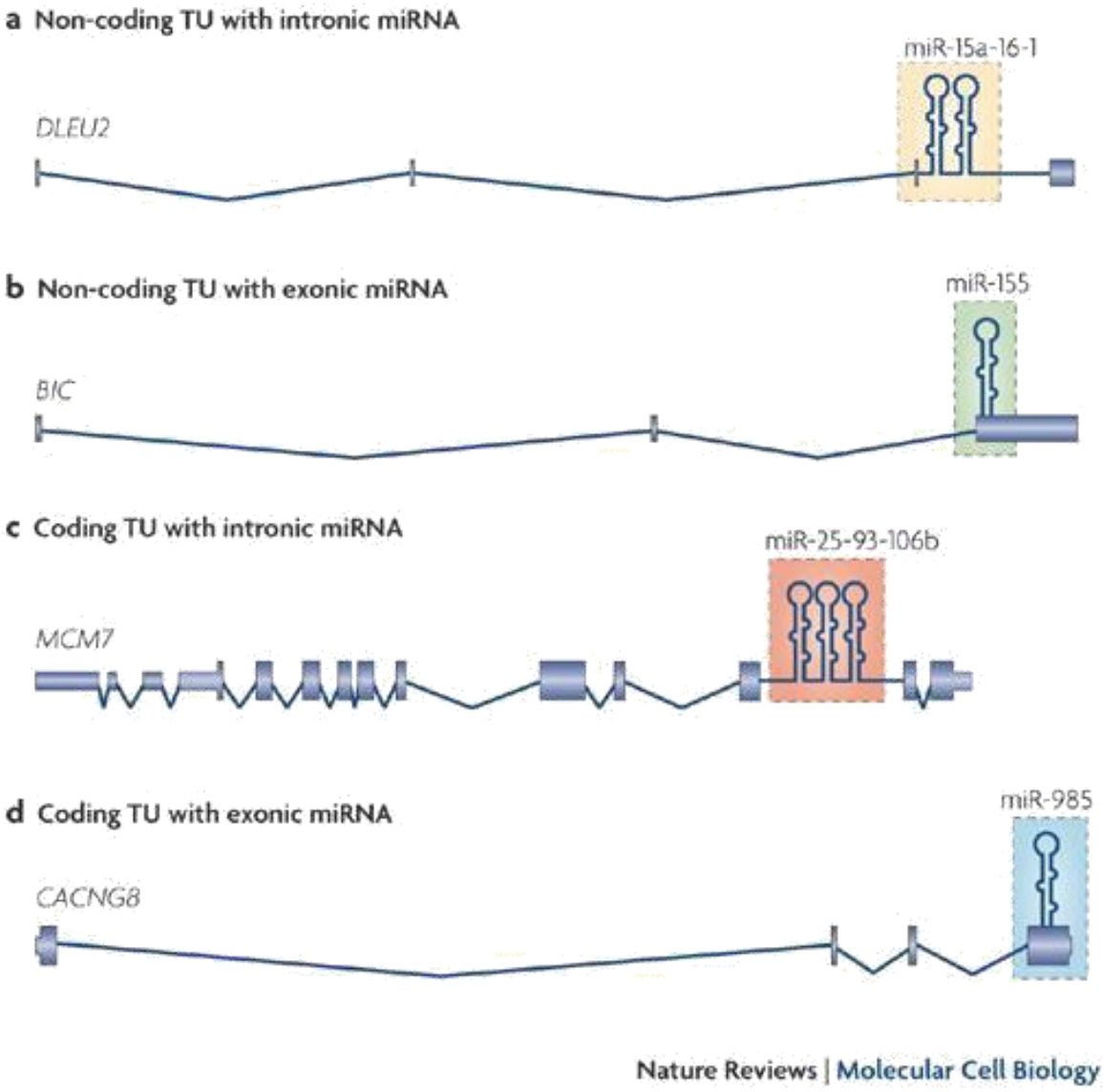


Figure 1. Organisation génique des microARN

L'expression des microARN peut être dépendante d'unités transcriptionnelles codantes par ailleurs pour une protéine (c, d) ou non (a, b). La position du miRNA sur le transcrit primaire peut être intronique (a, c) ou exonique (b,d). Une autre classification distingue les microARN *intergéniques* (leurs gènes sont compris à distance de gènes codant pour des protéines, et ont une unité transcriptionnelle qui leur est propre) et les microARN *introniques*, produits à partir de l'intron d'un gène codant par ailleurs pour une protéine, et dont l'expression dépend de celle du gène hôte.

(Kim et al., 2009)

I. Biogenèse des microARN

La production des microARN matures et fonctionnels dans la cellule se déroule en plusieurs étapes, débutant par la transcription dans le noyau d'un précurseur appelé « pri-miR ». Ce précurseur est ensuite maturé par le complexe *microprocessor* en une forme plus courte : le « pré-miR ». Après son export dans le cytoplasme, le pré-miR est à son tour clivé par l'enzyme Dicer et pris en charge par le complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*), permettant la production d'un microARN mature et fonctionnel.

Cette partie propose un résumé des données généralement admises de nos jours sur la biogenèse des microARN.

1. Transcription des microARN

a. *Organisation génique*

Les études de Lagos-Quitina et al. et de Lau et al. sont les premières à dresser un profil complet des différents types d'organisation géniques des microARN [4,5]. En effet, parallèlement à la mise en évidence des configurations en *cluster* (ensemble de microARN produits à partir d'un même pri-miR), leurs analyses génomiques montrent que les microARN peuvent se classer en fonction de leur position au sein des unités transcriptionnelles. On distingue dans un premier temps les microARN intergéniques[4], dont l'expression dépend d'un promoteur qui leur est propre, et les microARN introniques et exoniques dépendant des unités de transcription codantes ou non-codantes de leur gène hôte (figure 1)[6]. Dans le cas des unités transcriptionnelles codantes, ces configurations peuvent être à l'origine de boucles d'autorégulations. Un exemple bien décrit par van Rooij et al. est celui de miR-208, capable de réguler l'expression de facteurs de transcription ciblant le promoteur de son gène hôte, *MHC*[7]. Les miRtrons sont des cas particuliers de microARN introniques caractérisés par une voie de biogenèse non-canonique détaillée dans le paragraphe I.2.d[6]. D'autre part, ces configurations ne sont pas réparties également au sein du génome puisque les études de Mathelier & Carbone et de Maselli et al. montrent que les gènes de microARN sont généralement intergéniques (60%), souvent introniques (37%) et plus rarement exoniques (3%) [8,9].

a.

b.

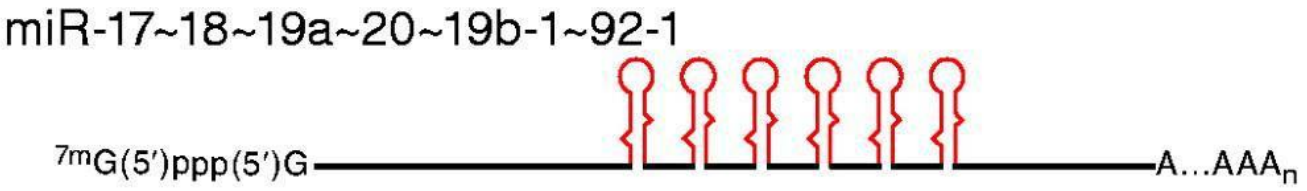


Figure 2. Représentation schématique des pri-miRNA monocistroniques et polycistroniques

La transcription des gènes des microARN, effectuée dans la plupart des cas par l'ARN polymérase de type II, permet la production d'un transcrit primaire (pri-miRNA ou pri-miR) qui peut être monocistronique (a) ou polycistronique (b) lorsqu'il est à l'origine de plusieurs microARN, en général homologues car résultant de duplications géniques.
(Du & Zamore 2005)

b. *Les ARN polymérases*

Les premières études s'intéressant aux modalités de la transcription des gènes des microARN ont d'abord suggéré que ce processus était dépendant de l'ARN polymérase de type III (ARN pol III) [10,11]. En effet, cette polymérase est connue pour transcrire préférentiellement les petits ARN. D'autre part, les transcrits qu'elle génère sont caractérisés entre autres par des répétitions d'uracyles au sein de leur séquence comparables à celles parfois observées sur les transcrits de microARN[11].

Cependant, Cai et al. et Lee et al. montrent en parallèle que les transcrits des microARN présentent également des structures propres à une transcription dépendante de l'ARN polymérase de type II (ARN Pol II) comme la présence d'une coiffe 7-methylguanosine (m7Gppp) en position 5' et d'une queue poly-adénine en position 3' [12,13]. Ces données sont notamment confirmées par l'enrichissement en gènes de microARN détectés suite à l'immunoprécipitation de la ARN pol II. L'analyse détaillée des promoteurs des gènes de microARN montre plus tard que ces séquences ne sont pas fondamentalement différentes des promoteurs de gènes classiquement transcrits par l'ARN pol II. En effet, Ozsolak et al. montrent que ces séquences contiennent des éléments de régulation de l'initiation de la transcription classiques tels qu'une *TATA box*, des ilôts CpG ou des sites de reconnaissances au facteur TFIIB[14].

Il est donc admis aujourd'hui que la majorité des microARN sont transcrits par l'ARN pol II, bien que quelques cas rares (tels que miR-886) restent exclusivement dépendant à la ARN pol III[15].

c. *La notion de cluster*

La transcription d'un microARN est à l'origine d'un premier long précurseur, le pri-miR. Dans environ 50% des cas, les pri-miR sont polycistroniques (figure 2), c'est-à-dire que leur maturation est à l'origine de la production de plusieurs microARN matures [16]. On parle alors de *cluster*. L'un des exemples les plus documentés étant le *cluster* 17-92, qui contient six microARN partiellement homologues car issus de duplications géniques très anciennes : miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 et miR-92a-1. Bien que les niveaux d'expression des membres d'un même *cluster* soient corrélés dans 76% des cas, il peut arriver qu'un membre s'exprime différemment des autres[17]. D'autre part, leurs rôles ne sont pas

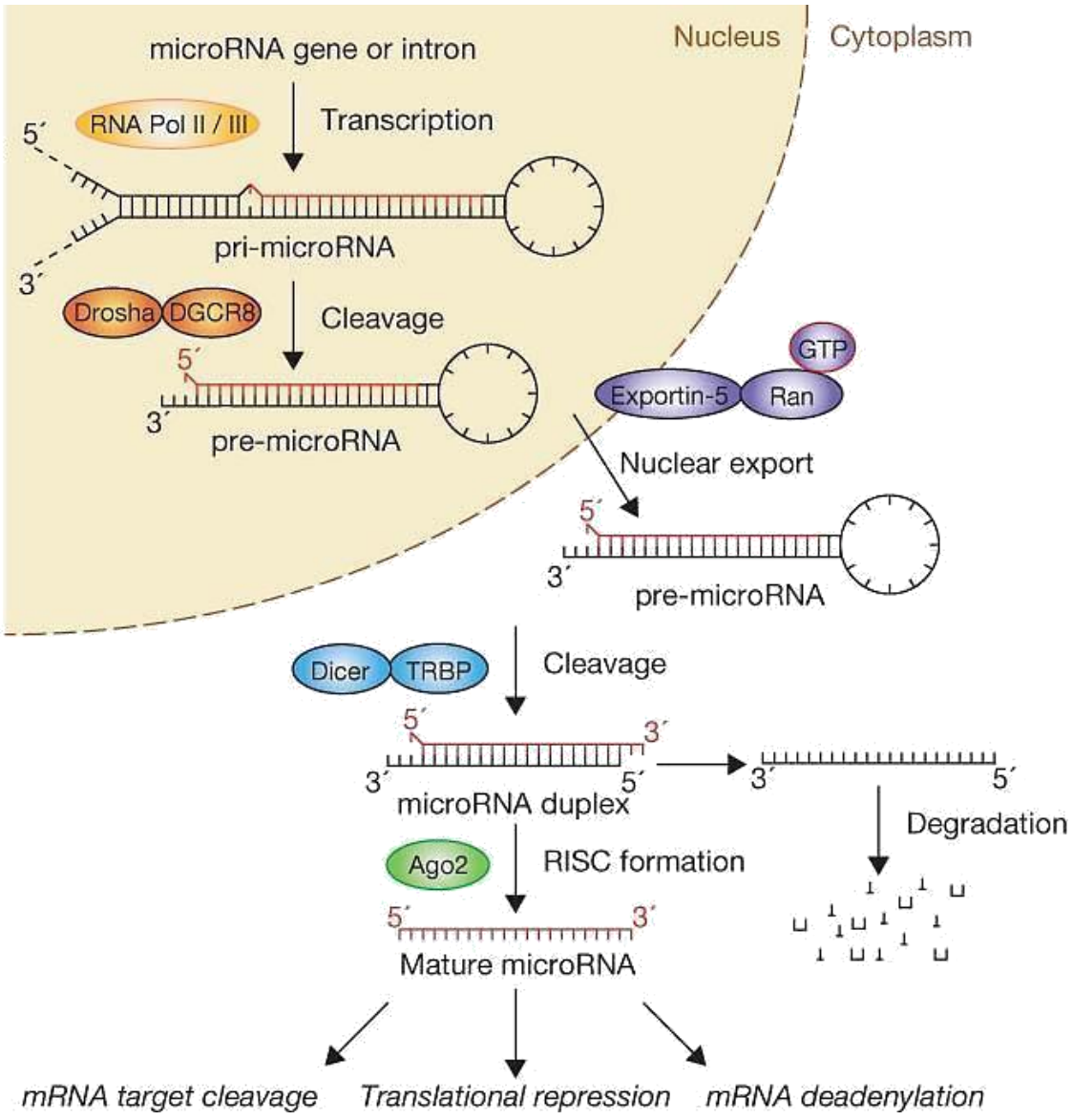


Figure 3. Représentation schématique de la biogenèse des microARN

Les microARN sont préférentiellement transcrits par la RNA polymérase II sous forme de pri-miRNA ou pri-miR. La première étape de maturation pri-miR est son clivage dans le noyau par la RNAse III Drosha. Le produit de ce clivage est le pre-miRNA ou pre-miR, un ARN de environ 70b ayant une structure tige-boucle qui sera exporté vers le cytoplasme par l'exportine-5 (XPO5). Le pre-miR subit ensuite une étape de maturation qui repose sur l'action de la RNAse III Dicer, qui produit une structure de type duplex double brin composé du brin *guide* (qui deviendra le microARN mature) et du brin *passager* (ou microARN*). Ce duplex est recruté au sein du complexe RISC, composé des protéines Dicer, TRBP et Ago, où aura lieu la dégradation du brin *passager*, et l'association du microARN mature avec ses cibles.

(Winter et al., 2009)

systématiquement redondants. En effet, l'étude de Mu et al. montre par exemple que parmi les microARN du *cluster* oncogénique miR-17-92, la seule surexpression de miR-19b-1 est suffisante pour induire la formation d'un lymphome[18].

2. Maturation des transcrits des microARN

Entre 2001 et 2004, Lee et al. et Lund et al. sont les premiers à mettre en évidence que la voie de biogenèse canonique des microARN est régie par une succession d'étape de maturation de leur transcrits. Ces étapes sont ainsi dépendantes de l'activité de deux endonucléases, Drosha et Dicer [13,19]. Cette voie, détaillée ci-dessous, est résumée dans la figure 3.

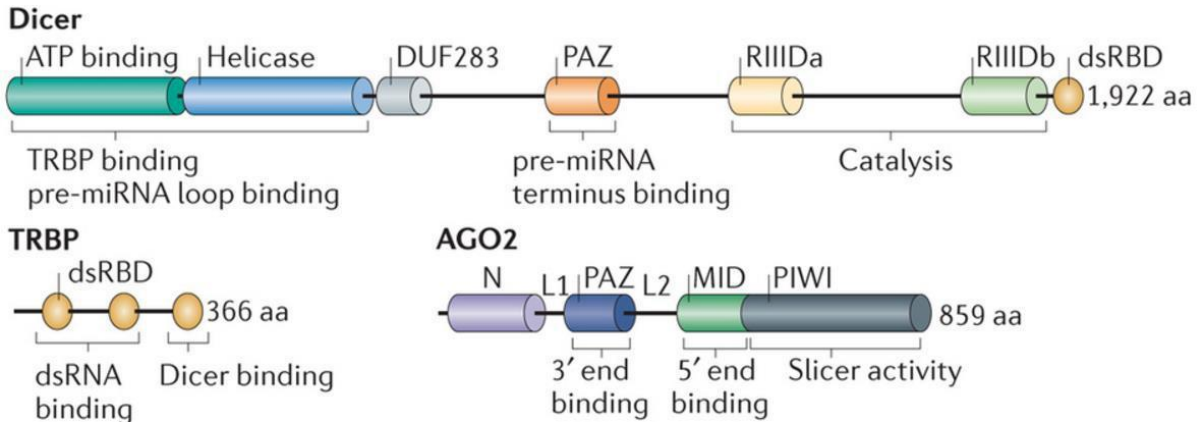
a. *Maturation nucléaire*

Après la transcription du pri-miR par l'ARN polymérase II, la première maturation du pri-miR s'effectue lors de sa prise en charge par le complexe *microprocessor* composé de l'enzyme RNAse de type III Drosha et de la protéine DGCR8 (*DiGeorge syndrome chromosomal region 8*)[10]. Les pri-miR ont une structure particulière en tige-boucle reconnue spécifiquement par DGCR8. Cette interaction va diriger le clivage du précurseur au niveau des 11 nucléotides suivants par Drosha[10]. Le produit de cette maturation est un « pré-miR » d'environ 70 nucléotides caractérisé par une structure en forme d'épingle à cheveux et une extrémité sortante de 2 nucléotides en position 3'[20].

b. *Export des précurseurs du noyau vers le cytoplasme*

L'export des pré-miR est dépendante de la reconnaissance de la structure double brin et de leur extrémité sortante par l'exportine-5, un récepteur appartenant à la famille des karyophérines β[19]. Dans le noyau, ce récepteur se lie spécifiquement au co-facteur RAN-GTP puis aux nucléoporines[21]. L'enzyme RAN-GAP (RAN-GTPase activating protein) permet l'hydrolyse de RAN-GTP en RAN-GDP pour faciliter le transport du pré-miR du noyau vers le compartiment cytoplasmique [22].

a.



b.

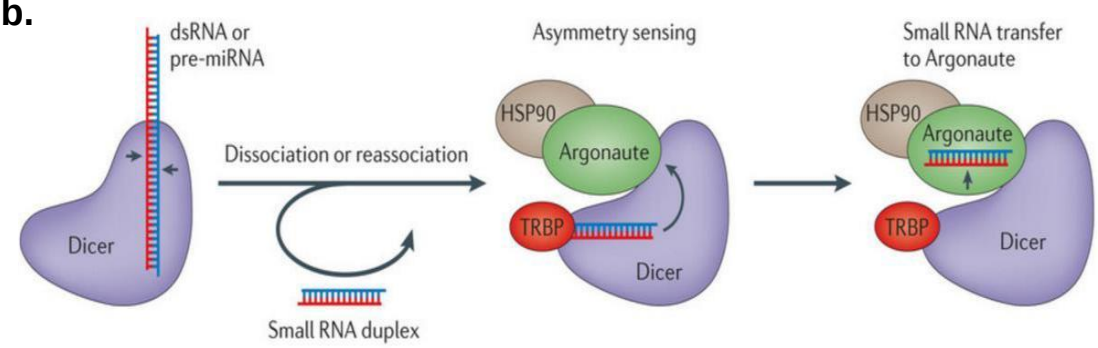


Figure 4. La formation du complexe RISC

a. Représentation schématique des domaines des trois protéines essentielles à la composition du complexe RISC.

b. Clivage du pre-miR par Dicer et recrutement du duplex microARN-microARN* par la protéine Ago dans le complexe RISC.

(Meister et al., 2013)

c. *Maturation cytoplasmique*

Cette dernière étape constitue l'un des points de la maturation des microARN les moins bien caractérisés actuellement. Les éléments moteurs de l'étape finale de la maturation du pré-miR sont dans un premier temps sa prise en charge par la RNAse de type III Dicer et son recrutement par la protéine protéine Argonaute (Ago) au sein du complexe RISC (*RNA induced silencing complex*) [23]. Le mécanisme d'action précis de ces différentes étapes de la maturation finale du microARN reste encore relativement mal défini. Ce paragraphe tente de restituer les connaissances communément admises aujourd'hui.

Recrutement du pré-miARN par Dicer

Dicer est une endoribonucléase composée des domaines protéiques shématisés en figure 4.a. Les fonctions des domaines N-terminaux (ATPase/helicase) permettent la stabilisation du recrutement de la protéine partenaire TRBP ainsi que la reconnaissance de la position de la boucle du pré-miR[24], tandis que les domaines C-terminaux PAZ (Piwi/argonaute/Zwille domain), RNAseIIIa/b et dsRBD (site de fixation aux séquences ARN double brin) sont impliqués dans la fixation et le clivage du pré-miR[25]. Lors de la maturation, le domaine PAZ initie la fixation avec le pré-miR *via* la reconnaissance de la structure simple brin sur 2 nucléotides en position 3' (figure 4.b). La protéine TRBP semble intervenir ici comme un élément stabilisateur de cette interaction[26]. La distance entre le domaine de fixation de PAZ et les domaines RNAse III détermine la position du clivage[27]. Le clivage de la boucle génère alors un duplex de microARN miR/miR* d'environ 20 nt, composé d'un brin guide et d'un brin dit « passager » (miR*).

Formation du complexe RISC

La protéine TRBP permet ensuite le recrutement d'un membre de la famille de protéine Ago et de leur co-facteur HSP90, complétant la formation du complexe RISC[24]. Les protéines Ago sont exprimées de façon ubiquitaire dans l'organisme. Il existe quatre sous-types, Ago 1 à 4, produits à partir de gènes distincts. Les gènes *Ago1*, *Ago3* et *Ago 4* sont regroupés sous forme de *cluster* au niveau chromosome 1 tandis qu'*Ago2* est isolé sur le chromosome 8[25]. Les domaines des protéines Ago sont résumés dans la figure 4.a. Elles se composent de deux domaines d'interactions ARN (PAZ et MID) en position N-terminal et d'un domaine catalytique endonucléase PIWI

(*P-element-induced wimpy testes*) uniquement fonctionnel dans le cas de la protéine Ago2 en position C-terminal [24,25].

Lors de la maturation, l'interaction entre la protéine HSP90 et Ago permet le recrutement du duplex de microARN (figure 4.b). Le duplex est orienté au sein de la poche PAZ/MID en fonction de la détection des extrémités 5' et 3' du duplex miARN/miARN* [24,25]. Les modalités du recrutement des duplex de microARN par l'un ou l'autre des membres de la famille Ago ne sont cependant pas parfaitement comprises. En effet, l'étude de Burroughs et al. montre que chaque membre Ago peut recruter préférentiellement certains microARN tandis que l'étude de Dueck et al. suggère que ce recrutement est totalement aléatoire [28,29].

Génération d'un microARN mature et fonctionnel

Le duplex miARN-miARN* est dissocié au sein du complexe RISC conduisant à la dégradation du brin passager selon un processus encore mal défini. Plusieurs hypothèses ont été proposées à propos du choix du microARN qui sera dégradé. L'étude de Hedda et al. suggère que la thermostabilité du duplex semble importante dans ce processus, et que le brin passager est choisi en fonction de l'enrichissement de sa séquence en pyrimidines par rapport au brin guide[30]. La fonctionnalité de ces brins passagers est rarement établie en dehors de quelques exemples récents, comme son implication dans la régulation de la prolifération cellulaire dans le modèle du cancer de l'ovaire ou la progression des carcinomes à cellules squameuses[31, 32].

Suite à la dégradation du brin passager, le microARN mature final, d'une longueur de 20 à 22 nucléotides, reste séquestré dans la poche PAZ/MID d'Ago, et le complexe RISC se dissocie selon un mécanisme encore mal défini. L'association de la forme mature du microARN et de la protéine Ago dans un complexe dit « miRISC » (*microRNA-induced silencing complex*) permet la fixation du microARN sur ses cibles[23].

d. *Cas des microARN à la biogenèse non-canonique*

Dans des cas particuliers, la maturation des microARN n'est pas dépendante de l'action successive des enzymes Drosha et Dicer.

Les miRtrons sont un premier exemple de maturation Drosha-indépendante[33]. En effet, le pri-miR est généré par le *spliceosome* suite à l'épissage d'un intron de très petite taille. La prise en charge de ces pri-miR particulier suit ensuite la voie de

biogenèse canonique comprenant l'export cytoplasmique (*via* l'exportine-5) et la seconde étape de maturation Dicer-dépendante [34]. En 2012, les travaux de Ladewing et al. déterminent une liste vingt-deux nouveaux miRtrons conventionnels chez l'humain et la souris tels que le microARN miR-6807 [35].

Le microARN miR-451 est un second cas particulier compte tenu de sa maturation indépendante de l'action de Dicer. En effet, le pri-miR est dans un premier temps classiquement pris en charge par l'enzyme Drosha, puis le pré-miR est exporté dans le cytoplasme grâce à l'exportine-5 [36]. Le pré-miR, plus court qu'un pré-miR classique, est ensuite directement recruté par la protéine Ago2. Cette dernière est le seul membre de la famille Ago à posséder une activité endonucléase capable de cliver le pré-miR-451 pour finaliser sa maturation [25, 37].

II. Mécanismes d'action

Les microARN sont des acteurs essentiels pour la régulation de l'expression protéique de la cellule. En effet, plusieurs études suggèrent leur capacité à réguler entre 30% et 60% des ARN messagers [38] alors qu'ils ne représentent à eux seuls que 1% à 3% du génome humain [39,40].

Peu de temps après leur découverte, Reinhart et al. identifient clairement que les microARN sont capables de réguler négativement la traduction d'ARN messagers en interagissant spécifiquement avec leur séquence 3' non-codante [41]. Plusieurs études généralisent plus tard ce mode d'action et montrent que cette fixation microARN-ARNm (miARN-ARNm) perturbe soit la stabilité d'un ARNm ciblé soit sa traduction [3,42]. D'autre part, d'autres modes d'action rarement décrits ne seront pas détaillés ici. Il s'agit de la capacité de certains microARN à stimuler la traduction d'un ARNm [43] ou à réguler la chromatine [44].

1. Détermination des ARNm cibles des microARN

a. *Principe du seed*

L'élément indispensable à l'action des microARN est l'intégrité de sa région de fixation sur l'ARNm cible. Cette séquence appelée « *seed* », comprise entre les nucléotides 2 et 8 en position 5' du microARN, est très conservée entre les espèces. Il

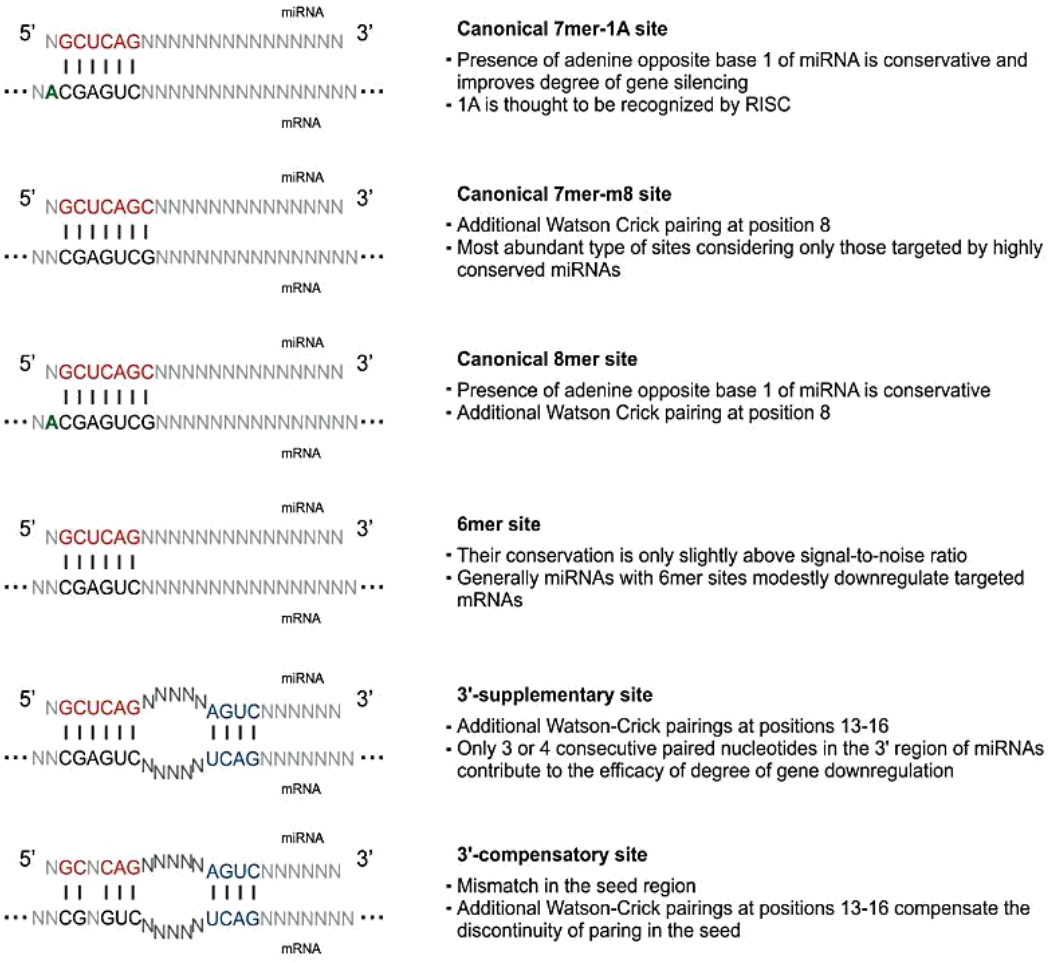


Figure 5. Représentation schématique des interactions microARN-ARNm canoniques et non-canoniques

En rouge, le *seed* du microARN.
En vert, l'adénine en position 1 sur la région de fixation de l'ARNm cible. En bleu, le site de fixation additionnel.

(Witkos et al., 2011)

faut savoir qu‘à ce jour seul le microARN-196 présente une homologie parfaite de l‘ensemble de sa séquence avec sa cible (le messager d‘HOXB8) [45] et que classiquement l‘intéraction miRNA-ARNm est imparfaite bien qu‘elle respecte les bases de l‘appariement Watson-Crick au niveau du *seed*.

La revue de Witkos et al. résume ci-dessous les trois types d‘appariement dits canoniques existant entre un microARN et sa cible (figure 5) :

- La configuration 7-mer : effective dans la majorité des cas, elle se caractérise par un appariement parfait du *seed* positionné après l‘adénine du messager faisant face au nucléotide en position 1 du microARN.
- La configuration 7mer-m8 : l‘appariement du *seed* est parfait sur les 7 nucléotides et présente un appariement additionnel de type Watson-Crick en position 8.
- La configuration 8mer : caractérisée à la fois par la présence de l‘adénine et de l‘appariement additionnel en position 8.

Il existe également trois autres types d‘appariements ne suivant pas ces modèles canoniques (figure 5). Le modèle 6mer présente un appariement de la région *seed* parfaite, sans élément additionnel de reconnaissance du site conduisant généralement à des effets de régulation moins important du fait de leur spécificité moindre. Les types d‘appariements 3’supplémentaires et 3’compensatoires vont se caractériser par un appariement Watson-Crick additionnel de la région 3‘ du microARN pour renforcer l‘interaction avec la cible ou compenser un mésappariement dans la séquence 5‘.

Le recrutement des protéines Ago en fonction du type d‘appariement est une question encore débattue aujourd‘hui puisque l‘étude de Burroughs et al., montre que chaque protéine Ago semble préférentiellement recrutée par un type de microARN alors que les études de Dueck et al. et Wang et al. montrent que ce recrutement est aléatoire [28,29]. Cependant ces études s‘accordent à dire qu‘Ago2 recrute environ 60% des microARN.

D‘autre part, bien qu‘un microARN ait la possibilité de cibler différents ARNm, tous ne sont pas régulés de la même façon en fonction du contexte cellulaire.

Les modalités du recrutement d‘un microARN sur une cible préférentielle restent donc encore mal définit aujourd‘hui. Cependant, la présence de l‘adénine en amont de la séquence de fixation du microARN semble importante dans ce processus, puisque la récente étude de Meyer et al. montre que la méthylation de ce nucléotide précis permettrait de guider le microARN vers sa cible [46].

b. *Caractérisation de la cible d'un microARN*

Analyses bioinformatiques

Des logiciels de prédiction ont été développés afin de faciliter la recherche des cibles potentielles d'un microARN en fonction de sa séquence de fixation. Ces logiciels comparent la séquence *seed* du microARN d'intérêt avec les séquences archivées dans des bases de données issues du séquençage de transcriptomes publiés tels que RefSeq ou Ensembl. Les logiciels classiquement utilisés tels que TargetSan, miRanda, PicTar, DIANA-microT, rna22 et PITA permettent d'effectuer des croisements d'informations issues de différentes bases de données [3]. Les résultats se présentent sous une forme de liste d'ARNm potentiellement ciblés par le microARN d'intérêt en fonction d'un score de prédiction relatif à la spécificité de l'intéraction miARN-ARNm. Cette spécificité dépend de différents paramètres pris en compte par les logiciels et, entre autre, du type de mésappariements identifiés, de l'énergie de l'interaction, ou de la conservation de cette interaction entre les espèces [3]. Le tableau 1 ci-contre résume les différentes performances et caractéristiques propres à chacun de ces logiciels.

Les résultats obtenus à partir de ces analyses bioinformatiques peuvent donc être différents en fonction des logiciels utilisés compte tenu des paramètres et spécificité mise en avant par chaque outil. Il est ainsi préférable de combiner ces études entre elles afin d'identifier des cibles communément retrouvées. D'autre part, la majorité des cibles proposées ne sont pas nécessairement validées par des études *in vitro* et *in vivo*. Il est donc nécessaire de compléter cette première approche *in silico* par d'autres études confirmant le lien entre le microARN d'intérêt et sa cible identifiée. Enfin, en dehors des logiciels rna22 et PITA, la majorité de ces outils informatiques ne prennent pas en compte la fixation possible des microARN au niveau des séquences 5' non-codantes et des séquences codantes (CDS) des ARNm cibles[3]. Pourtant, l'étude de Tay et al. a montré que certains microARN sont capables de se fixer au niveau des régions codantes des ARN messagers des facteurs de transcriptions NANOG, OCT4 et SOX2 afin de moduler la différenciation des cellules souches embryonnaires. D'autre part, l'étude d'Ørom et al. montre que le microARN miR-10a est capable de se fixer dans la région 5' non-codante des ARNm des protéines ribosomales afin d'en activer la traduction [43].

Pour ces différentes raisons, ces analyses *in silico* doivent être complétées par des approches expérimentales afin de déterminer des cibles claires et fonctionnelles de microARN.

Confirmation d'un ARNm cible d'un microARN

L'une des méthodes d'étude les plus largement utilisée est l'analyse protéomique en réponse à une sur-expression ou une sous-expression artificielle d'un microARN. Les modulations d'expression induites dans le protéome permettent alors de confirmer ou d'identifier de nouvelles cibles potentielles du microARN étudiés [47]. L'interaction miARN-ARNm est ensuite confirmée *in vitro* par transfection de construction plasmidique portant un gène rapporteur (généralement la luciférase) auquel est ajoutée la région 3' non-codante d'un ARNm d'intérêt. L'effet des modulations artificielles de l'expression du microARN d'intérêt sur l'expression de la luciférase permet de confirmer ou non l'intéraction miARN-ARNm étudiée.

Des méthodes d'immunoprécipitation des protéines Ago ont également été développées mais sont plus rarement utilisées compte tenu de la complexité des étapes étapes à réaliser. Le séquençage des ARN (microARN et ARNm cibles) associé aux protéines Ago immunoprécipitées permet d'identifier des intéractions fonctionnelles entre les microARN et les ARNm cibles. Cette méthode dite de « *HITS-CLIP* » (*high-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation*) a notamment permis de montrer que la majorité des microARN se fixent comme attendu dans les régions 3' non codantes des ARNm cibles, mais qu'également 37% d'entre eux se fixent au niveau des régions codantes des messagers (CDS) [48].

L'ensemble de ces approches *in vitro* ont l'avantage de confirmer les interactions miARN-ARNm fonctionnelles et de pouvoir mettre en évidence de nouvelles cibles potentielles non répertoriées dans les bases de données utilisées par les logiciels de prédiction.

2. Mécanismes de répression de l'expression génique

Le rôle de répresseur traductionnel des microARN sur les ARNm est aujourd'hui consensuel bien que le mécanisme d'action précis reste encore discuté. La plupart des études proposent que les microARN agissent soit sur la traduction soit sur la stabilité des ARNm [42 39 16 23]. L'action préférentielle de l'un ou l'autre de ces mécanismes n'est

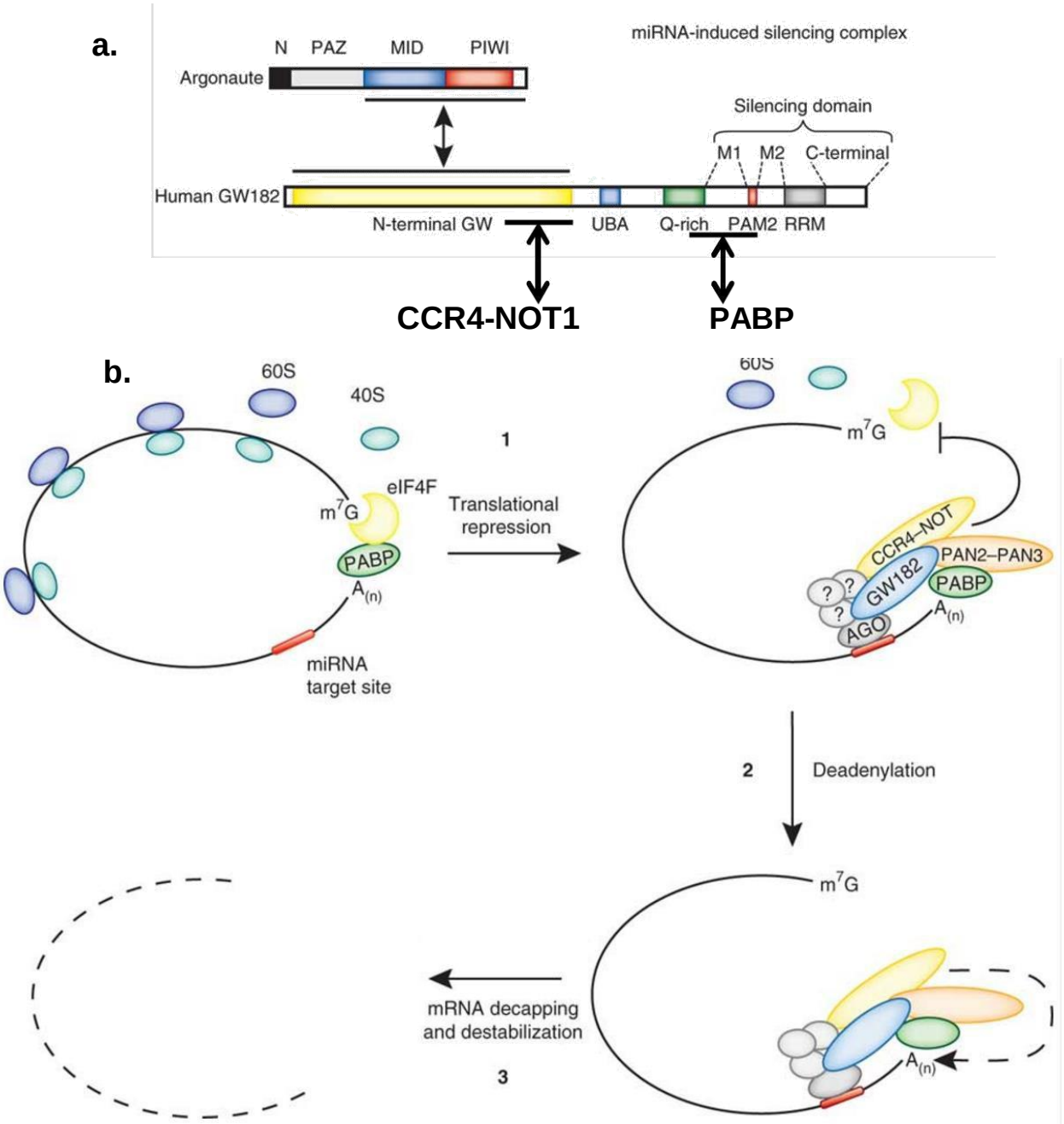


Figure 6. Modèle de mécanisme d'action des microARN

a. Schéma des domaines d'interactions de GW182 avec les autres acteurs impliqué dans le l'action des microARN.

b. Mécanisme d'inhibition de la traduction par les microARN : La traduction est dépendante du recrutement de la protéine PABP au niveau de la queue poly-A de l'ARNm, qui interagit avec les facteurs d'initiation de la traduction eIF4G, eIF4E et eIF4A recrutés au niveau de la coiffe 5' de l'ARN messager. L'interaction d'un microARN avec un ARNm aboutit (i) à une perturbation de cette interaction, ce qui se traduit par une diminution de l'efficacité de la traduction et (ii) à la déstabilisation de l'ARNm par élimination de la coiffe et dégradation de la queue poly-A. La protéine GW182 est un élément central dans ce double mécanisme de régulation, en interagissant avec PABP et CCR4-NOT.

aujourd'hui pas clarifiée bien que l'étude de Guo et al. en 2010 suggère que l'inhibition de la traduction (n'induisant pas de modifications du taux d'ARNm dans la cellule) semble modeste par rapport à l'activité de déstabilisation des messagers [49].

a. *Acteurs et localisation du processus de la répression traductionnelle*

Suite à la dissociation du complexe RISC, le microARN reste pris en charge par la protéine Ago au sein du cytoplasme [50 51]. L'élément moteur de l'activité de répression traduction va être la formation du complexe miRISC (*microRNA- RNA induced silencing complex*) composé du microARN mature, de la protéine Ago et de son partenaire GW182 [52]. La protéine GW182 possède un domaine N-terminal enrichi en répétition glycine-tryptophane (GW) permettant son association avec les membres de la famille Ago au niveau des domaines d'intéractions MID et PIWI (figure 6.a). Cette protéine constitue l'élément architecte dans le recrutement des partenaires nécessaires au mécanisme de répression traductionnel du miRISC.

La localisation précise des évènements de répression traductionnelle *via* l'intéraction miARN-ARNm au sein du cytoplasme reste encore débattue. Cependant, plusieurs études suggèrent qu'elles ont lieu dans des structures dynamiques appelées « P-bodies » contenant une forte concentration de molécules impliquées dans ces différents mécanismes de régulation [53 54]. Le domaine C-terminal de GW182 se comporte un domaine dit de « *silencing* » composé d'éléments enrichis en glutamine et d'une séquence d'ubiquitination semblant être responsable de la localisation du miRISC dans les *P-bodies* [55].

b. *Inhibition de la traduction*

L'initiation de la traduction est dépendante du recrutement de la protéine PABP au niveau de la queue poly-adénine (poly-A) de l'ARNm (figure 6.b). Elle est alors capable d'interagir avec les facteurs d'initiation de la traduction eIF4G, eIF4E et eIF4A recruté au niveau de la coiffe 5' de l'ARN messager. La formation de cette structure en forme de boucle va favoriser le recrutement des ribosomes lors de la phase d'élongation de la traduction [56].

La protéine GW182 du complexe miRISC présente un domaine de fixation à PABP dans son domaine *silencing.* La fixation du complexe miRISC au niveau de la séquence 3' non-codante du messager permet alors à GW182 d'entrer en compétition

avec la queue poly-A pour induire la dissociation de la protéine PABP [52]. La circularisation de l'ARNm est ainsi déstabilisée (figure 6.b), ne permettant plus le recrutement des facteurs d'initiation de la traduction [56].

c. *Dégradation des ARNm*

La réponse de dégradation des ARNm peut être différente en fonction du membre de la famille Ago recruté dans le complexe miRISC, et du type d'appariement du microARN prise en charge.

Dans le cas d'un microARN présentant un appariement parfait du *seed* avec sa cible et pris en charge par la protéine Ago2 dans le complexe miRISC, la structure double brin induite par l'interaction miARN-ARNm est clivée par l'activité endonucléase d'Ago2. L'ARNm est ensuite dégradé par l'exoribonucléase XRN1 (dans le sens 5'-3') et par l'exosome (dans le sens 3'-5') [52].

Lorsque le *seed* présente un mésappariement avec la séquence 3' non-codante de l'ARNm cible, la dégradation du messager va alors être dépendante de la déadénylation suivit de l'enlèvement de la coiffe m7G [57] (figure 6.b).

La protéine GW182 permet le recrutement du complexe de déadénylation CCR4-NOT1 *via* son domaine N-terminal enrichie en répétition GW (figure 6.a) [58]. La fixation de CCR4-NOT1 déstabilise alors l'interaction entre PABP et la queue poly-A. La protéine NOT1 intéragit alors directement avec la déadénylase CAF-1, responsable de la déadénylation de la queue poly-A. La dégradation 3'-5' de l'ARNm dépendant alors du recrutement de l'exosome [59].

Contrairement au mécanisme de déadénylation, la dissociation de la coiffe n'est pas dépendante d'une interaction directe avec la protéine GW182 [60]. En effet, le recrutement du complexe DCP2 semble plutôt dépendant de la reconnaissance globale de la configuration du complexe miRISC [60]. L'activité hydrolytique du complexe DCP2 permet alors de dissocier la coiffe m7G présence à l'extrémité 5' de l'ARNm. Son accès est ainsi libéré conduisant à la dégradation rapide du messager dans le sens 5'-3'*via* l'exoribonucléase XRN1 [57].

III. MicroARN et cancers

Depuis 2005, la dérégulation de l'expression des microARN a été rapportée dans de nombreuses études. En effet, Lu et al. proposent même à cette époque une classification des tumeurs en fonction des expressions fréquemment dérégulées de certains microARN [61]. Ces dérégulations peuvent s'expliquer par des anormalités chromosomiques, des régulations transcriptionnelles particulières, des altérations de la voie de biogenèse des microARN ou des modulations épigénétiques. De très nombreuses études suggèrent ce lien entre microARN et cancer sans que des relations de causes à effet ne soient systématiquement présentées. Ce paragraphe présentera donc un exemple des microARN dont le potentiel oncogénique ou suppresseur de tumeurs a été largement décrit dans plusieurs modèles de cancers.

1. Dérégulation de l'expression des microARN

a. *Anormalités chromosomiques*

L'expression anormale d'un microARN dans une cellule cancéreuse peut s'expliquer par une altération du génome au niveau du nombre de copie du gène ou de sa localisation (amplification, délétion ou translocation).

Le *cluster* miR15a/16-1 en est un exemple puisqu'il s'agit de la première mise en évidence d'un lien clair entre microARN et cancer [62], puisque la délétion de ce gène conduit à une leucémie lymphocytique chronique (B-LLC). D'autres microARN présentent une surexpression dépendante d'une amplification génique. Les exemples du cluster miR-17-92 et de miR-155 sont les mieux décrits et le rôle de cette amplification génique est respectivement rapporté dans les modèles de mélanomes, cancer de l'ovaire, cancer du sein et leucémie lymphoblastiques aigües et dans les lymphomes de Burkitt [63 64 65]. Enfin, l'étude de Calin et Croce montre le rôle critique des anomalies chromosomiques touchant les microARN[62]. En effet, leur analyse génomique met en évidence que les gènes des microARN sont souvent associés à des zones génomiques fragiles sujettes à des pertes d'hétérozygotie (lorsqu'il s'agit de gènes suppresseurs de tumeur) ou à des amplifications (pour les oncogènes).

b. *Régulation transcriptionnelle*

Les facteurs de transcription les plus largement étudiés dans la régulation de l'expression des microARN sont c-myc et p53.

O'Donnell et al., sont les premiers à montrer que la surexpression du *cluster* miR-17-92 est transcriptionnellement régulé par c-myc [66]. Plus tard, l'étude générale de Chang et al. sur la caractérisation de microARN régulés par c-myc et fonctionnels dans la carcinogenèse démontre que ce facteur de transcription inhibe directement l'expression de plusieurs microARN (miR-15a, miR-26, miR-29, let-7) potentiellement capables de cibler des transcrits de gènes suppresseurs de tumeurs [67]. D'autre part, l'étude récente de Wang et al. en 2014 met en évidence un mécanisme particulier de boucle d'autorégulation critique dans l'hépatocarcinogenèse entre le microARN miR-122 capable de réguler l'expression de c-myc, régulant lui-même transcriptionnellement ce microARN [68]. L'ensemble de ces travaux montrent le rôle déterminant de c-myc dans la régulation de l'expression de plusieurs microARN important dans la survie, la prolifération, les modifications épigénétiques ou la prolifération.

Le second facteur important dans l'oncogenèse et lié aux microARN est le suppresseur de tumeur p53, connu pour être inactivé par mutation ou non exprimé dans plusieurs modèles de cancers et pour son rôle déterminant dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose [69]. L'exemple majeur de l'effet de p53 sur la régulation de microARN est démontré par les équipes de Oren et al. et de Mendell et al. montrant que la régulation transcriptionnelle du cluster miR-34 peut jouer un rôle déterminant dans la progression du cycle cellulaire, et dans la réponse apoptotique dans plusieurs modèles de cancers [70]. D'autre part, les travaux de Suzuki et al., suggèrent également que p53 joue un rôle fort dans la modulation de l'activité du complexe RISC en favorisant la biogenèse de microARN au potentiel suppresseur de tumeur[71]. Ces différents axes de régulations sont notamment connus pour leurs effets décrits sur la prolifération, la survie, l'angiogenèse ou la transition épithélio-mésenchymateuse [72]

c. *Défaut dans la biogenèse des microARN*

La dérégulation des éléments de la biogenèse des microARN est logiquement corrélée avec la dérégulation de l'expression de ceux-ci. En effet, dans le cas des

tumeurs Wilm‘s, la mutation par substitution/délétion d‘un nucléotide dans *DGCR8* et *Drosha* est directement responsable de la diminution significative de l‘expression de let-7a et de miR-200, deux microARN impliqués fonctionnellement dans le mécanisme de ces tumeurs[73]. En dehors des études associant les dérégulations d‘expression de Dicer et Drosha avec des augmentations significative des capacités tumorales réversibles avec leur *knock-down* (KD), l‘étude de Karube et al. Montre également une corrélation claire entre le niveau d‘expression de l'ARNm de Dicer et de let-7[74]. D‘autre part, l‘étude de Melo et al., souligne l‘importance de maintenir l‘intégrité d‘expression des différents acteurs de la voie de biogenèse des microARN puisque ses résultats semblent démontrer que l‘expression de la forme tronquée de l’exportine-5 (par mutation inactivatrice du gène) conduit à une accumulation nucléique de pre-miRs et pri-miRs dans le noyau des cellules de tumeurs modèles à microsatellites[75]. Ces travaux suggèrent également que la restauration de l‘exportine 5 sous sa forme active permet d‘inverser ce phénomène et contribue même au mécanisme de suppression de la tumeur.

d. *Modulations épigénétiques*

Les mécanismes de régulation épigénétiques de l‘expression génique peuvent être regroupés dans deux catégories[76] :

- La méthylation de l‘ADN (sous l'action d'ADN méthyltransférases), qui concerne certaines cytosines localisées dans les ilôts CpG des régions promotrices des gènes et qui conduit au *silencing* de ceux-ci.
- Les modifications post-traductionnelles des histones favorisant l‘expression génique, dans le cas des acétylations (produites par les histones acétyltransférases), ou induisant un *silencing* des gènes dans le cas des méthylations (action d‘histones méthyltransférases).

De très nombreuses études proposent un lien entre régulation épigénétiques et carcinogenèse. Les gènes dont l'expression est affectée par ces mécanismes peuvent être des suppresseurs de tumeurs ou des oncogènes[76], mais également des gènes de microARN, comme cela a été fréquemment démontré.

L‘étude Saito et al. montre en effet dès 2006 que ces régulations peuvent contribuer à la régulation de l‘expression des microARN[77] (Saito et al., 2006): le traitement de cellules de carcinomes de la vessie par des inhibiteurs des enzymes de

méthylation de l'ADN et d'acétylation des histones conduit à la surexpression de 17 microARN parmi les 313 étudiés dans ce modèle. Ces résultats sont également confirmés par les travaux de Scott et al. montrant que le traitement de lignées cellulaires de cancer du sein par des inhibiteurs des enzymes d'acétylation des histones conduit à une modification rapide du profil microARN. Ainsi, le *silencing* de microARN suppresseurs de tumeurs tels que miR-34b-c ou miR-145-5p ont par exemple été associé à la progression des cancers colorectaux, des mélanomes et des glioblastomes [79,78]. L'étude de Lujambio et al. montrent également que ce *silencing* de miR-34b-c est associé à la progression métastasique dans ces modèles[79].

Au-delà des microARN dont l'expression est contrôlée par des régulations épigénétiques, il existe quelques exemples de microARN capables de cibler et de réguler l'expression des acteurs essentiels à cette machinerie. Les travaux de Fabbri et al. ont montré dans le modèle du cancer du poumon que le *silencing* de miR-29, ciblant les ADN méthyltransférases DNMT3A et DNMT3B, semblait jouer un rôle important dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs[80]. Dans un second exemple, miR-101 est décrit pour cibler directement l'histone méthyltransférase EZH2. Dans le modèle du cancer de la prostate, son expression diminuée est ainsi corrélée à l'augmentation de l'expression de EZH2 et à la progression tumorale du cancer, compte tenu de l'effet inhibiteur induit par EZH2 sur l'expression de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs[81].

2. MicroARN oncogéniques et suppresseurs de tumeurs reconnus

Plusieurs microARN ont été rapportés pour être surexprimés ou sous-exprimés dans la majorité des modèles de cancers[82], permettant même de proposer une classification des tumeurs en fonction de la récurrence de ces dérégulations d'expression[61]. Les appellations de « oncomicroARN » et microARN « suppresseurs de tumeur » ont alors été appliquées à ces microARN respectivement surexprimés et sous-exprimés dans les différents types de cancers.

a. *OncomicroARN reconnus*

miR-155

Le microARN miR-155 est un microARN exonique positionné au sein de l'unité transcriptionnelle non codante de *bic* sur le chromosome 21. En 2004, Metzler

et al. montrent que l'expression de miR-155 est activé par le facteur oncogénique c-myc dans le modèle des lymphomes de Burkitt[65]. De nombreuses études viennent corréler par la suite ces observations, démontrant notamment que la surexpression de miR-155 est retrouvée dans de nombreux modèles de tumeurs tels que les cancers du sein, du col de l'utérus, du pancréas ou encore du poumon[83]. De nombreuses cibles sont actuellement décrites et référencées dans la revue de Sun et al.[84]. Cependant, peu d'études montrent clairement un rôle fonctionnel oncogénique de la régulation de celles-ci. L'exemple le mieux décrit est celui de la régulation directe de la RhoA-GTPase par miR-155 dont le rôle est démontré dans le maintien et la stabilité des jonctions cellulaires et la migration[84]. D'autre part, le potentiel oncogénique de miR-155 a notamment été mis en évidence dans les travaux de l'équipe de O'Connell montrant que stimuler l'expression de miR-155 avec des agents pharmacologiques conduit à l'apparition d'un désordre myéloprolifératif[85]. Enfin, de récentes études mettent en avant un lien entre l'expression de miR-155 et la chimiorésistance de patients atteints de cancer du rein, ajoutant au potentiel oncogénique fonctionnel démontré de ce microARN [86].

miR-21

MiR-21 est le microRNA le plus fréquemment surexprimé dans les cancers et le mieux caractérisé à ce jour. En effet, l'étude menée par Volinia et al. qui analyse l'expression des miRNAs dans des échantillons correspondant à six types de tumeurs solides, montre que miR-21 est le seul miRNA surexprimé dans tous les types tumoraux analysés[82]. Sa surexpression est également plus largement rapportée dans les glioblastomes, les carcinomes de la tête et du cou, les cancers ovariens, les lymphomes B, les leucémies, les carcinomes hépatocellulaires, les cancers du col de l'utérus, du sein, du colon ou encore du poumon [87]. D'autre part, les cibles caractérisées de miR-21 sont majoritairement composées d'un grand nombre de gènes suppresseurs de tumeur[87,88]. Il est important de noter que parmi le grand nombre de cibles répertoriées pour miR-21, peu d'entre elles ont cependant été fonctionnellement caractérisées. De façon générale, miR-21 semble jouer un rôle dans l'angiogenèse et la régulation de la réponse apoptotique à travers la régulation de deux cibles très largement étudiées, PTEN et PDCD4. En effet, les résultats de Liu et al. montrent que la répression du facteur pro-apoptotique PTEN par miR-21 permet l'activation des voies de signalisation AKT/ERK favorisant l'expression des facteurs angiogéniques HIF et

VEGF [89]. D'autre part, plusieurs études mettent également en avant le rôle anti-apoptotique de miR-21 à travers la régulation du facteur PDCD4 largement décrit pour son potentiel pro-apoptotique dans le modèle du cancer du colon[90]. Enfin, les travaux de Médina et al. sont les premiers à proposer le mot *oncomicroARN* pour miR-21 et la dépendance de la tumeur à miR-21[91]. En effet, l'induction conditionnelle de l'expression de miR-21 par un système Tet-Off dans le modèle de souris montre que la seule présence du microARN est suffisante pour induire un lymphome de type B, et que bloquer cette expression par l'ajout de doxocycline conduit à la régression tumorale[91]. La surexpression de miR-21 dans ce modèle entraine donc la dépendance de ces tumeurs à miR-21[91]. Cette étude est la première à montrer que l'oncogenèse peut être dépendante de l'expression d'un microARN.

miR-17-92

Le *cluster* miR-17-92 se compose de six microARN chez l'homme : miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b-1, miR-20a et miR-92-1. Plusieurs études ont longtemps décrits ce cluster comme un oncomicroARN strict en raison de sa surexpression rapportée dans de nombreux modèles (lymphomes, cancer du poumon, cancer du côlon, cancer du pancréas et de la prostate), de sa régulation transcriptionnelle et de sa régulation génique décrite précédemment [92,23]. Les différents paralogues du *cluster* miR-17-92 semblent présenter des fonctions oncogéniques différentes. En effet, des études menées par l'utilisation de gènes rapporteurs ont notamment montrés que le facteur pro-apoptotique PTEN est une cible préférentielles des membres miR-19a et miR-19b-1, tandis que l'expression des facteurs de transcription E2F1 semble spécifiquement régulée par miR-20a. Ces deux grandes cibles largement décrites participent au rôle prolifératif et anti-apoptotique du cluster miR-17-92 [66,93]. Plus récemment, les travaux de Zhu et al. montrent le rôle oncogénique *in vivo* de mir-17-92 dans l'hépatocarcinome du foie. Cette étude montre entre autre que la surexpression spécifique de miR-17-92 dans les cellules hépatiques dans des souris transgéniques conduit à une hépatocarcinogenèse plus importante que dans le cas des souris contrôles, suggérant le potentiel oncogénique fort de ce microARN[94].

b. *MicroARN suppresseurs de tumeurs reconnus*

Les microARN dits « suppresseurs de tumeurs » sont moins nombreux à avoir été caractérisés comme tels que les microARN oncogéniques.Ils se caractérisent principalement par une sous-expression rapportée dans plusieurs modèles de cancer et leurs rôles fonctionnels anti-prolifératifs. Cette fonction est en général sous-tendue par une capacité à réguler négativement des ARNm codant pour des protéines oncogéniques.

Let-7

Let-7 est le deuxième microARN découvert chez *C.elegans*. Chez l'homme, il possède de multiples isoformes, homologues au niveau de leur séquence *seed*, et rassemblées dans la famille let-7[95]. Le rôle suppresseur de tumeur de plusieurs membres de cette famille réside dans leur capacité à cibler les transcrits d'oncogènes impliqués dans la différenciation et la croissance cellulaire[95]. Peu de cibles de let-7 sont actuellement référencées. Parmi elles, la régulation de RAS et de HMGA2 sont deux exemples concrets du rôle suppresseur de tumeurs de let-7. En effet, plusieurs études rapportent dans le modèle du cancer du poumon que let-7 bloque l'oncogenèse en réprimant directement l'expression de l'oncogène RAS [95]. D'autre part, HMGA2 est une protéine associée au modelage de la chromatine et donc importante dans l'initiation de la transcription. Sa forme tronquée est fréquemment associée à l'oncogenèse, et se caractérise par une perte des sites de fixation de let-7 au niveau de la région 3'-UTR de son messager, conduisant à une différenciation cellulaire abérrante [96]. Le rôle de let-7 dans la régulation de l'oncogenèse est encore confirmé aujourd'hui, notamment par l'étude plus récente de Madison et al. suggèrant que la déplétion de let-7 favorise la carcinogenèse intestinale[97].

Le cluster miR-15a/16

Le cluster de microARN miR-15/16 est décrit pour être localisés dans la région chromosomique 13q14. Cette région est particulièrement étudiée en oncologie compte tenu de sa fréquente délétion[98]. Ces données sont confirmées par plusieurs laboratoires par des méthodes de *Northernblot* combinées avec des études de l'intégrité allélique LOH (*Loss of heterozygosity*) sur des échantillons de patients et des lignées de divers modèles[99]. Plusieurs articles suggèrent un rôle pro-apoptotique de miR-15a/16,

principalement au travers de la régulation de BCL2 et MCL1[100]. Ces résultats ont notamment été obtenus suite à l'analyse des effets de la modulation de l'expression de miR-15a/16 sur le transcriptome et le protéome. Leurs rôles dans l'oncogenèse sont ensuite confirmés dans plusieurs publications comme celles de l'équipe de Cimmino et al., dans un premier temps, puis de Croce et al., dans le modèle de la leucémie lymphoblastique chronique[98,101]

c. *MicroARN oncogéniques ou suppresseurs de tumeur en fonction du contexte*

Le microARN miR-146a agit sur plusieurs mécanismes cellulaires tels que la survie, la prolifération, la migration, l'invasion et la différenciation des cellules cancéreuses au travers de gènes cibles différents [64,102]. Les souris transgéniques possédant une délétion génétique de miR-146a développent des tumeurs au niveau des organes lymphoïdes secondaires, suggérant un rôle anti-tumoral de miR-146a[103]. Son expression semble de plus dérégulée dans plusieurs types de cancers où il peut être anti-tumoral mais également favoriser le développement tumoral dans d'autres cas. En effet, miR-146a est décrit pour être un miARN anti-tumoral ou gène suppresseur de tumeur dans le cas du cancer de la prostate, du cancer gastrique, des lymphomes à cellules NK/T ou encore de gliomes [64,102]. A l'inverse, l'expression de miR-146a est augmentée dans certains cas et semble favoriser le développement du cancer gastrique, du cancer de l'utérus ou du cancer de la thyroïde [64,102].

3. Utilisation potentielle des microARN comme biomarqueurs de diagnostic et de suivi thérapeutique

L'identification de microARN au potentiel oncogénique et suppresseur de tumeurs suggère que ces dérégulations d'expression peuvent constituer des causes et non des conséquences de l'oncogenèse. D'autre part, l'étude de Lu et al. montrent dès 2005 que les tumeurs peuvent être classées en fonction de l'expression récurrentes de certains microARN (miR-21 ou miR-17-92 par exemple)[61]. Ce contexte scientifique justifie qu'aujourd'hui plusieurs laboratoires s'intéressent à l'étude des microARN comme potentiels biomarqueurs de diagnostic, mais aussi de suivi d'évolution des cancers ou de prédiction de réponse thérapeutique. Ces analyses présentent également un intérêt pour la prise en charge des patients puisqu'elles s'effectuent

classiquement sur des échantillons sanguins issus de prélèvements non-invasifs. En effet, Schwarzenbach et al. montrent en 2014 que les microARN ont l'avantage par rapport aux ARNm d'être exprimés de façon stable dans le sang et aux fluides corporels tels que la salive ou les urines[104]. Actuellement, les études se sont particulièrement focalisées sur les modèles de cancer du poumon, du sein, du pancréas, de la prostate, colorectaux ainsi que dans la leucémie myéloïde chronique (LMC)[95,105]. Le résultat de ces analyses est résumé dans le tableau 2. Ces études utilisent pour la plupart une méthode de quantification et de caractérisation du profil microARN (NGS ou *microarray*) permettant l'analyse d'échantillons sanguins ou plasmatiques de patients par rapport aux sujets sains. Ces résultats sont ensuite confirmés par une méthode RT-qPCR présentant l'avantage d'être sensible. Certains panels de microARN identifiés semblent sont ainsi proprement dédiés au diagnostic de la pathologie tandis que d'autre semble caractéristiques de l'évolution du cancer vers un stade plus agressif (cas de la LMC et du pancréas) ou vers un stade métastatique

(dans le cas du poumon, du sein, du cancer colorectal et de la prostate). D'autre part,

les études de Chen et al., Hansen et al. et Jurkovicova et al., ont également permis de mettre en évidence certains microARN potentiellement capables de distinguer les échantillons de patients chimiorésistants par rapport aux échantillons de patients sensibles aux traitements[106–108].

D'autre part, l'implication des microARN dans la régulation des processus

pathologiques a conduit au développement de molécules thérapeutiques potentiellement capables de cibler l'expression d'un microARN précis. Deux molécules sont ainsi en cours de tests cliniques, le Miravirsen et le MRX34[95,105]. Le Miravirsen est une molécule présentant une séquence inverse et complémentaire à miR-122, essentiel pour la réplication du virus de l'hépatite C[95,105]. Les premiers

résultats semblent prometteurs puisque l'administration du Miravirsen conduit une

réduction significative des ARN viraux chez les patients, sans que celui-ci ne développe de résistances au traitement. La seconde stratégie thérapeutique cliniquement testée dans les cas de cancers du foie est le MRX34. Cette molécule est un analogue de synthèse de miR-34, concentré dans des nanoparticules accumulables par le foie et permettant de restaurer artificiellement l'expression de miR-34, un microARN suppresseur de tumeur[95,105].

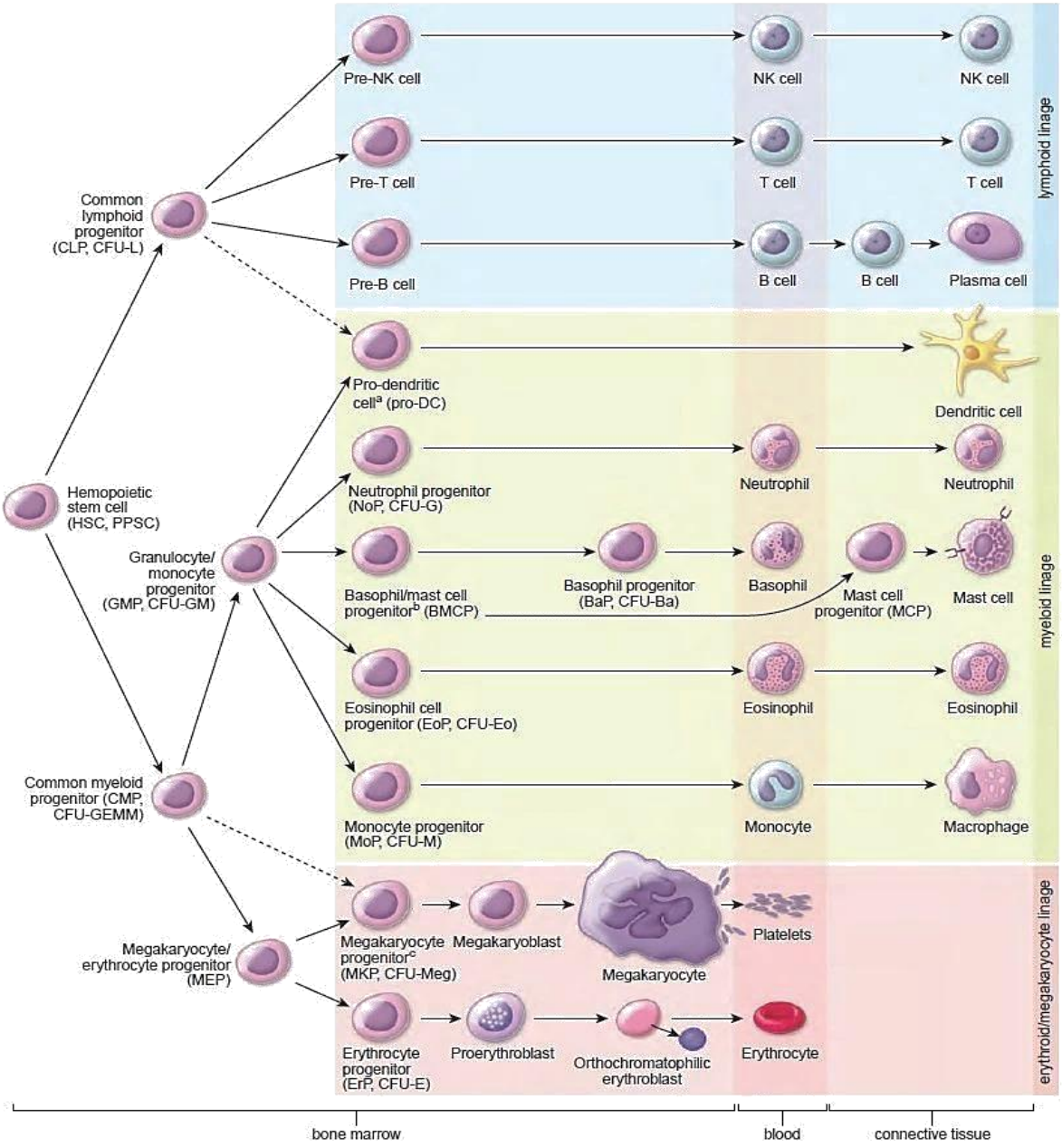
Chapitre 2 :
La cellule souche hématopoiétique et l'hématopoièse

Les cellules souches jouent un rôle primordial au cours du développement. En effet, d'abord dans l'embryon (sous forme de cellules souches embryonnaires), leur présence persiste à l'état adulte jouant un rôle essentiel dans le renouvellement et la production des cellules de l'individu. Elles se définissent de façon consensuelle par à la fois leur capacité d'auto-renouvellement permettant de maintenir le stock (*pool*) de cellules souches et leur capacité de différenciation en cellules spécialisées. Ces caractéristiques sont régies par deux types de division cellulaire distincte[109] :

- La division symétrique : Homoplastique lorsque la cellule mère donne deux cellules filles identique, permettant le renouvellement du *pool* de CSH, ou hétéroplastique lorsque que la cellule mère se divise deux cellules différenciées et identiques.
- La division asymétrique : Lorsque la cellule mère se divise en une cellule identique et une cellule plus différenciée.

Il existe actuellement cinq classes de cellules souches différentes, chacune définie en fonction du tissu d'origine et de leur plasticité cellulaire (tableau 3).

Compte tenu de la thématique de recherche du laboratoire, ce chapitre s'intéresse particulièrement à la cellule souche hématopoïétique, son rôle dans l'hématopoïèse et les modalités de régulation de ses propriétés de quiescence et d'autorenouvellement. D'autre part, ce chapitre présentera un résumé des études ayant
montré le rôle fondamental des microARN dans la régulation de l'hématopoïèse.



<u>Figure 7. Représentation schématique des différentes étapes de l'hématopoïèse</u>

L'hématopoïèse est un processus de différenciation hiérarchique permettant la production de l'ensemble des cellules matures composant le sang. Les cellules souches hématopoïétique (CSH) constituent les cellules d'origine des lignées myéloïde et lymphoïde. Les différentes étapes de différenciation se déroulent en interaction avec le microenvironnement médullaire, avant que soient libérées les cellules matures dans le sang circulant.

(O'hara et al 2013)

I. L‘hématopoïèse

L'hématopoïèse est un processus permettant le renouvellement continu et régulé de l'ensemble des cellules composant notre sang. La stabilité de ce processus de renouvellement est très importante puisque chaque jour il permet de créer environ 10^{13} cellules sanguines afin de renouveler le stock de cellules terminales [110]. Au cours du développement, le siège de l'hématopoïèse va évoluer entre le tissu conjonctif, le foie et la rate à l‘état fœtal avant de devenir un processus exclusivement médullaire dès la naissance[109].

L'arbre hématopoïétique se divise en quatre grands types cellulaires caractérisés par un degré de différenciation et de maturation différents (figure 7). La cellule souche hématopoiétique (CSH) est la cellule d'origine de cette hiérarchie hématopoïétique. Comme toutes les cellules souches spécialisées, elle se caractérise par ses capacités de multipotence (capacité de donner tous les types de cellules hématopoiétiques) et d'auto-renouvellement [109,110]. La CSH se divise d‘abord en progéniteurs multipotents (progéniteurs communs lymphoide et myéloïde), puis en progéniteurs oligopotents pour le cas de la lignée myéloïde (MEP et GMP). Ces progéniteurs oligopotents (et multipotents pour la lignée lymphoïde) vont ensuite se diriger vers des stades de différenciation de plus en plus engagés, BFU et CFU, que l‘on distingue, là encore en fonction de leur degré d‘immaturité [109,110]. Chaque types de progéniteurs va ensuite se différencier en précurseurs qui sont les premières cellules morphologiquement identifiables et ayant perdu la capacité d'auto-renouvellement. La succession de ces évènements de maturation se déroule au sein de la moelle osseuse (pour les CSH, progéniteurs et précurseurs) et aboutit à la libération des cellules matures différenciées dans le sang dans le sang circulant (lymphocytes T, B, NK pour la lignée lymphoïde et plaquettes, macrophage, granulocytes et erythrocytes pour la lignée myéloïde) [109,110].

II. Méthodes d‘étude de la CSH

En 1914 Neumann et al. émettent pour la première fois l‘hypothèse que la moelle osseuse constitue le siège de l‘hématopoïèse[109,110]. Dans le même temps, Maximov et al. soumettent leur théorie d‘un processus cellulaire hématopoïétique

hiérarchique présentant une d'origine commune à toutes les cellules finales différenciées. Les accidents nucléaires ont été une des premières observations allant dans le sens de cette hypothèse compte tenu de la létalité des syndromes d'aplasie médullaire développés par les personnes irradiés[109,110]. Les premiers tests de greffes allogéniques de moelle osseuse chez la souris ont permis de confirmer définitivement ces hypothèses. Ces observations, ainsi que les travaux de Lorenz et al. en 1951 sur la reconstitution de moelle osseuse par greffe sur souris irradiées, ne mettent cependant pas en évidence le caractère hétérogène des populations cellulaires présentent au cours de l'hématopoièse[109,110].

Ce n'est que dans les années 60 que les expériences de Till & McCulloch et de Becker démontrent la présence de cellules avec des degrés d'immaturité différents dans la moelle osseuse[111]. En effet, les résultats de leurs travaux montrent la formation de nodules spléniques au bout de 10 jours, suite à l'injection de cellules de moelle osseuse de souris saines à des souris irradiées de manière létale. Ces nodules nommés alors « *Colony Forming Unit-Spleen* » (CFU-S), ont révélé après examen histologique être composés de cellules hématopoïétiques différenciées ou en cours de différenciation et de même origine clonale. Des travaux plus tardifs ont cependant révélé que les CFU-S correspondaient, non pas à des CSH, mais plutôt à des progéniteurs primitifs [112,111,113].

Ces avancées historiques ont ainsi ouvert la voie au développement de plusieurs tests et marquages cellulaire permettant la caractérisation de cette population immature hétérogènes.

1. Caractérisation fonctionnelle de la CSH

Parmi les principaux tests fonctionnels développés pour observer ces populations de cellules souches hématopoiétiques hétérogènes, deux approches sont envisagées : une approche *in vitro*, reposant sur la culture des cellules en milieu liquide ou semi-solide et une approche *in vivo*, basée sur la capacité des cellules à reconstituer une hématopoïèse normale après injection à des animaux irradiés[109,110]. Cependant, il est important de noter que ces méthodes permettent d'étudier les propriétés souches d'une population d'intérêt sans pour autant permettre une focalisation sur une cellule en particulier.

a. *Etudes in vitro*

L'étude *in vitro* se base sur l'utilisation de deux techniques permettant la caractérisation spécifique des progéniteurs et précurseurs hématopoiétiques.

Le test clonogénique ou Colony-Forming Cell (CFC) assay

Ces premiers tests sont effectués dès les années 1970 par Metcalf et al. et Bradley et al. qui montrent une différence de potentiel de différenciation et de prolifération entre les cellules de moelle osseuse de souris mis en culture [113].

Le principe de ce test est d'orienter la prolifération et la différenciation cellulaire sur un temps maximum de 14 jours afin de distinguer les populations progénitrices BFU et CFU. De nos jours, les échantillons cellulaires à tester sont mis en culture dans un milieu semi-solide contenant de la méthylcellulose, en présence de cytokines favorisant différenciations granulocytaires, macrophagiques ou erythrocytaires (décrits en III.2). Les BFU sont des progéniteurs plus immatures que les CFU puisque leur mise en culture *in vitro* permet d'obtenir des colonies cellulaires différenciées plus importantes et multicentriques en 14j alors que les CFU se caractérisent par des colonies plus petites en 7 jours, démontrant la perte progressive de leur capacité d'auto-renouvellement[109,110,114].

Le test d'identification de *Long Term Culture-Initiating Cell* ou LTC-IC

Ce test a été adapté aux cellules hématopoiétiques humaines par Sutherland et al., en 1989 à partir du protocole développé par Dexter en 1977 [115]. Elle repose sur un système de culture à long terme de 5 semaines en milieu liquide en présence d'une couche de cellules stromales de moelle osseuse murine[109,110,114]. Ces cellules permettent de recréer un microenvironnement médullaire, *via* l'expression ou la sécrétion de facteurs de croissance, de cytokines et de molécules d'adhésion nécessaires à la survie et à la prolifération des cellules hématopoïétiques. Ce test permet de mettre en évidence la présence de progéniteurs myéloïdes, lymphoïdes ainsi que les cellules multipotentes par la formation de colonies [109,110,114]. A l'issue de cinq semaines de mise en culture, les cellules différenciées meurent, permettant d'identifier les cellules avec un fort potentiel d'auto-renouvellement capable de former à nouveau des colonies. Les LTC-IC identifiées sont confirmées par une seconde mise en culture pour mettre en évidence leur capacité à donner à nouveau au moins un progéniteur déterminant d'une lignée[109,110,114].

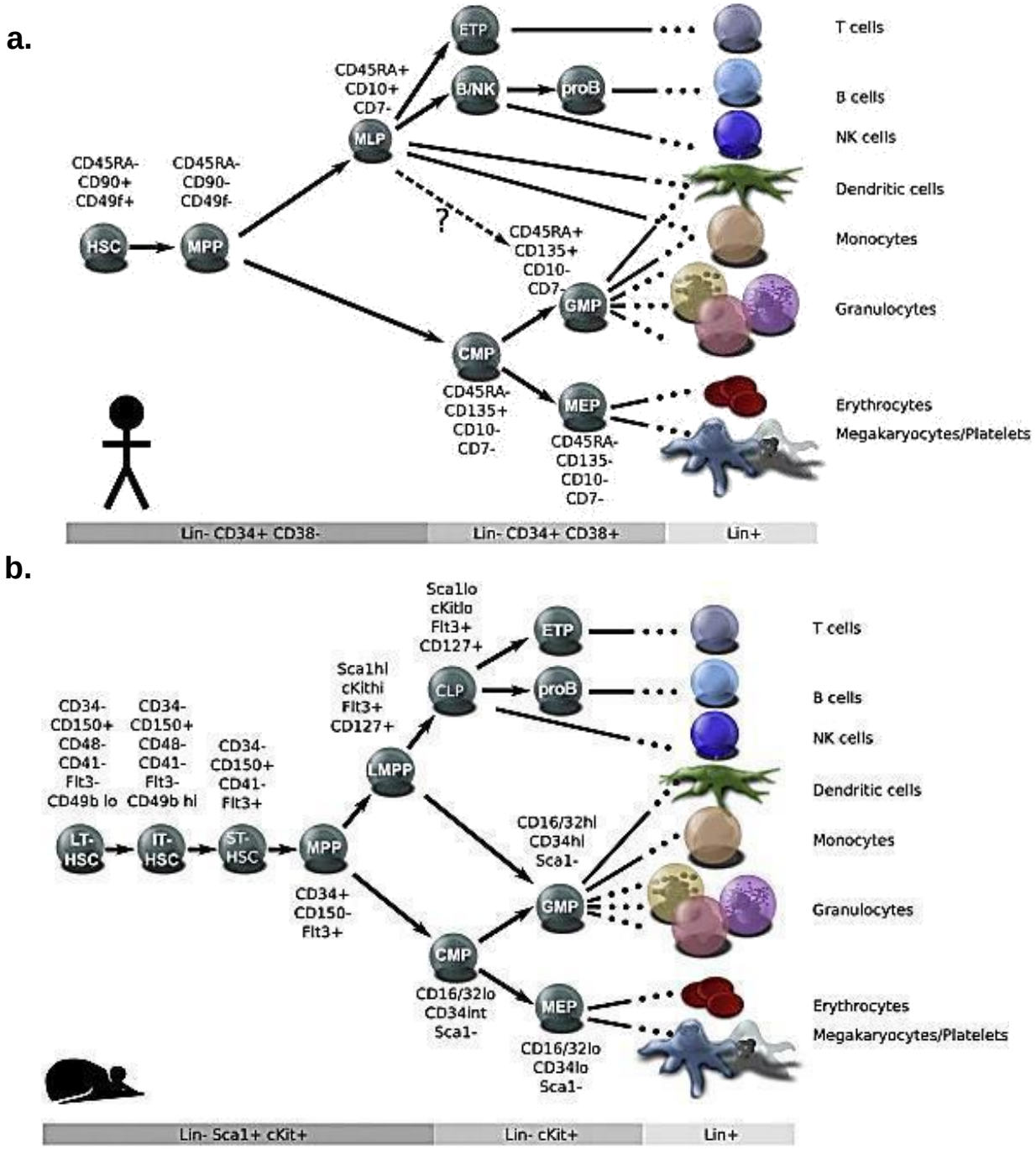


Figure 8. Représentation schématique des marqueurs de surface propres aux cellules hématopoïétiques humaines et murines

a. Hématopoïèse humaine et marqueurs de surface spécifiques.
b. Hématopoïèse murine et marqueurs de surface spécifiques.

Doulatov et al., 2012

b. *Tests in vivo*

Les tests *in vivo* sont actuellement incontournables dans la démonstration du caractère souche d'une population cellulaire étudiée. En effet, les tests de greffes syngéniques (souris/souris) ou xénogéniques (homme/souris) effectués dans des modèles de souris irradiés permettent de mettre en évidence le caractère multipotent et la capacité d'auto-renouvellement d'une cellule présente dans l'échantillon testé en se basant sur sa capacité de reconstitution hématopoiétique à long terme. Deux sous-populations de CSH ont été définis grâce à ce test [116 117] :

- la CSH de court terme (ST-CSH) capable de reconstituer les compartiments myéloïde et lymphoïde de la souris receveuse sur 2 à 3 semaines.

- la CSH de long terme (LT-CSH), plus immature que la ST-CSH, mise en évidence au bout de 20 semaines et confirmée par sa capacité de reconstitution hématopoiétique au cours d'une greffe secondaire.

Ainsi, l'injection primaire permet de tester la multipotence des cellules immatures contenues dans la population d'étude tandis que l'injection secondaire permet de tester leur potentiel d'autorenouvellement. Il est important de noter que ce test permet d'évaluer précisémment le nombre de cellules souches présentent dans l'échantillon. En effet, si l'on procède à une série de greffes avec une dilution du nombre de cellules de la population à étudier, une analyse utilisant la loi de Poisson permet de déterminer théoriquement le nombre de CSH.

2. Marqueurs cellulaires de la CSH

a. *Marqueurs de surface*

Les méthodes d'isolement des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques reposent majoritairement sur la détection d'antigènes de surface en utilisant des anticorps monoclonaux couplés soit à des billes magnétiques (séparation sur colonnes immuno-magnétiques), soit à des molécules fluorescentes (séparation par cytométrie de flux et tri cellulaire). Ces techniques font intervenir des molécules présentes à la surface des cellules et nommées antigènes de différenciation (ou CD pour « *Clusters of Differentiation* »). La co-expression de certains de ces marqueurs permet de caractériser chaque sous-population présente au cours de l'hématopoièse. Ces différentes combinaisons d'expression chez l'homme sont résumées dans la figure 8.a.

Le premier marqueur d'immaturité des cellules hématopoïétiques, le CD34, a été proposé en 1984 par Civin et al.. Dans leurs travaux, la sélection des cellules exprimant ce marqueur de suface permet un enrichissement de cellules capables de reconstituer une hématopoïèse normale lorsqu'elles sont greffées chez une souris receveuse myéloaplasiée[118]. Ce marqueur de surface est encore utilisé aujourd'hui pour caractériser les CSH. Cependant, Calvin et al. suggèrent dès 1990 que cette population n'est pas homogène dans son degré d'immaturité[109,110,114]. Depuis, de nombreux travaux ont clairement montrés que l'utilisation de marqueurs de surfaces additionnels est nécessaire à l'identification de ces différentes sous-populations. En effet, il est admis aujourd'hui que la fraction cellulaire la plus enrichie en cellules souches est définit par les marqueurs de surfaces $CD34^{+}CD45RA^{-}CD49f^{+}CD90^{+}CD38^{low}Lin^{-}$ [119]. Cette population cellulaire spécifique se caractérise par une capacité de reconstitution de l'hématopoïèse à long terme (LT-CSH), tandis que la perte de l'expression de CD49f et CD90 est spécifique d'une sous-population de progéniteurs multipotents (MPP) possédant une capacité de greffe transitoire [120]. Il est toute fois important de noter que l'utilisation de ces combianaisons de marqueurs de surface n'est pas systématiquement consensuelle. En effet, des expériences de greffes sérielles et de culture *in vitro* ont également montré que la formule $CD34^{+}CD133^{+}CD90^{+}CD38^{low}$ permet d'obtenir une population riche en LT-CSH [121,122].

b. *Marquage intra-cellulaire*

Il est admis depuis plusieurs années que 80% des CSH de la moelle osseuse sont bloquées en phase de quiescence G1/G0[114]. Des méthodes d'études de la CSH utilisant ces propriétés ont ainsi été développées afin de permettre de travailler de façon plus précise sur cette population. Des drogues cytotoxiques, comme le 5-FU (5-Fluoro-Uracile), permettent par exemple la déplétion des cellules en cycle et l'enrichissement en cellules primitives : les cellules résistantes au 5-FU représentent ainsi une population de CSH et de progéniteurs très immatures[114,123].

L'autre caractéristique propre aux CSH est leur expression massive de pompes à efflux membranaires telles que le transporteur MDR1 (glycoprotéine de type P) ou ABCG2[114,123]. Le colorant vital intracellulaire Hoechst 333342 est classiquement utilisé dans ces expérimentations. En effet, ce marqueur fluorescent se lie

spécifiquement à l'ADN et à l'ARN lorsqu'il est incorporé dans la cellule. Un marquage négatif permet donc de rendre compte de l'activité intense des pompes à efflux. Cette population marquée négativement est appelée « *side population* ». L'équipe de Brunet de la Grange montre par ailleurs que l'utilisation combinée de cette technique avec le double marquage de surface $CD34^{+}CD38^{low}$ permet d'obtenir une population cellulaire avec un potentiel de greffe encore plus important, suggérant un enrichissement en CSH par rapport à une population seulement $CD34^{+}CD38^{low}$ [124].

D'autres marqueurs métaboliques peuvent également être utilisés pour isoler des populations hématopoïétiques primitives comme l'expression spécifique de l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) dans les CSH et les progéniteurs[114,123]. Ainsi, les populations présentant une activité positive de l'ALDH disposent d'un potentiel de reconstitution hématopoïétique fort[125,126].

De façon générale, ces différentes méthodes d'isolement ne permettent pas d'obtenir une population souche pure mais plutôt un enrichissement de plus en plus important en CSH. De ce fait, les études de caractérisation de marqueurs propres aux CSH constituent encore aujourd'hui un grand domaine d'intérêt.

3. Les modèles murins

Les modèles murins constituent actuellement un modèle de choix *in vivo* concernant l'étude de l'hématopoïèse. En effet, les étapes de différenciation hématopoïétiques conservées entre l'humain et la souris permettent de mieux comprendre et de mieux caractériser les différentes étapes régissant ce processus[127,128]. Cependant, il faut tenir compte du fait que les marqueurs cellulaires ne sont pas conservés entre les espèces. De ce fait, la population classiquement étudiées en qualité de cellules souches hématopoïétiques murines sont caractérisés par les marqueurs de surfaces $Lin\text{-}Sca1^{+}Kit^{+}$, dites LSK [127,128](figure 8.b). D'autre part, certains auteurs incitent à prendre en compte la taille et la régulation du cycle de vie différent entre les humains et la souris. Ces paramètres semblent potentiellement pouvoir induire un biais dans les résultats compte tenus du vieillissement prématurés des CSH murines par rapport aux CSH humaines[128]. Cependant, la configuration des compartiments hématopoïétiques conservés dans la moelle osseuse ainsi que les caractéristiques similaires des CSH humaines et murines concernant les marquages intracellulaires

démontrent clairement que ce modèle reste incontournable dans les études *in vivo* portant sur l'hématopoïèse[127,128].

4. Source des CSH

Les cellules primaires hématopoiétiques s'obtiennent à partir de prélèvement enrichi en cellules mononuclées obtenues à partir de sang de cordon ombilical, de sang périphérique ou de ponction de la moelle osseuse. Les sangs de coron sont la source préférentielle pour l'obtention de CSH puisqu'ils permettent d'obtenir jusqu'à huit fois plus de cellules immatures que les prélèvements de sang périphérique ou de moelles osseuses[122]. Cependant, ces différentes sources ne sont pas inépuisables, et parfois difficiles à obtenir notamment en raison du caractère invasif des ponctions. L'absence de modèles d'étude *in vitro* pour palier à ces limites justifie aujourd'hui l'intérêt de développer de nouveaux modèles de l'étude de la CSH. Ces travaux se focalisent ainsi sur la génération de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) issue de la reprogrammation cellulaires de cellules différenciées, ramenées par traitement *in vitro* à un état d'immaturité semblable à celui des CSH. Les résultats prometteurs permettent d'espérer de développer des modèles *in vitro* procurant une source de cellules illimités et comparables entre elles[129,130].

III. Régulation de l'hématopoïèse

Comme nous l'avons vu précédemment, le siège de l'hématopoïèse adulte a clairement été démontré pour être situé dans la moelle osseuse. Ces études ont été complétées par les travaux de Patt et Maloney démontrant en 1970 que l'hématopoïèse est un processus n'apparaissant qu'après la formation de l'os dans le modèle murin[131]. Le concept de « la niche hématopoïétique » apparait pour la première fois en 1978 dans les travaux de Schofield, suggérant que le maintien des caractéristiques de la CSH ainsi que les modalités de l'orientation de sa différenciation sont régit par un système complexe de facteurs intrinsèques et extrinsèques, généré en fonction des signaux induits par le microenvironnement médullaire[132]. Compte tenu de la complexité des éléments régissant ces processus, ce chapitre présentera un résumé de ses acteurs principaux décrits dans différentes publications.

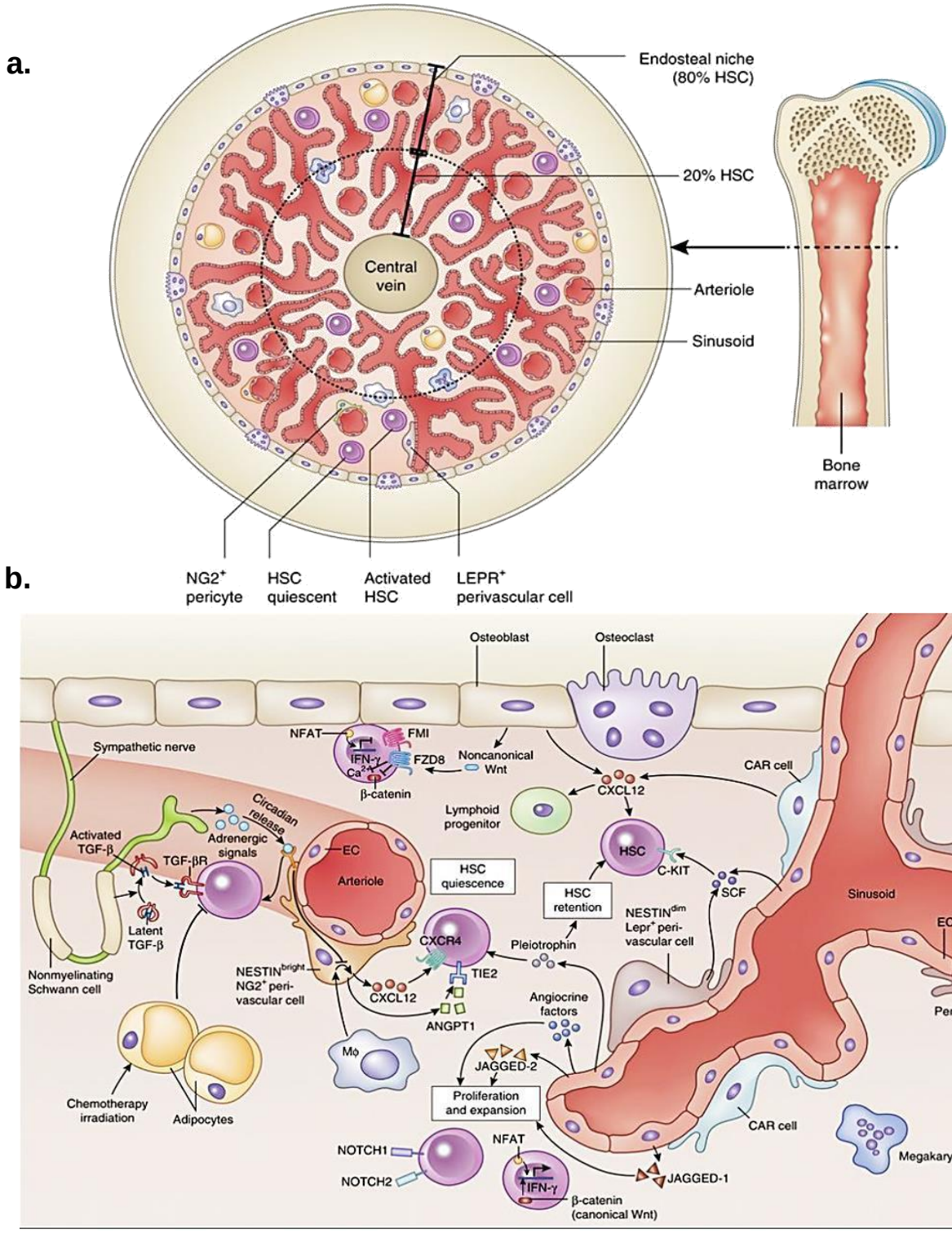


Figure 9. Le microenvironnement médullaire et le fonctionnement des niches hématopoiétiques

a. Schéma d'organisation de la moelle osseuse.

b. Schéma des interactions permettant la régulation des CSH dans la niche hématopoïétique au travers de leur rétention, de leur maintien en quiescence et de leur prolifération/différenciation.

(Mendelson & Frenette 2014)

1. Le Microenvironnement médullaire

La moelle osseuse est un compartiment extrêmement innervé et vascularisé avec une structure organisée permettant des échanges directs avec le sang périphérique (figure 9.a). Les différentes zones de la moelle osseuse sont réparties de façon à orienter l'état de différenciation de la CSH en fonction de son recrutement vers deux types de niches hématopoiétiques, endostéales et sinusoidales[133]. Bien que différentes fonctionnellement, ces niches restent cependant étroitement liées en terme de proximité à travers les différents acteurs cellulaires qui les composent[134] (figure 9.b) :

- Les cellules hématopoiétiques : CSH, progéniteurs et précurseurs hématopoïtiques.
- Les cellules stromales : d'origine mésenchymateuses (CSM : cellules sinusoïdales vasculaires endothéliales et réticulaires, ostéoblastes, adipocytes) ou neurale non myélénisées (cellules de Schwann)
- Les cellules de la matrice extra-cellulaire, qui produisent fibronectine, fibres de collagène, laminine, throbospondine.

a. *Les niches endostéales et sinusoidales*

La niche endostéale

L'endoste constitue la limite entre l'os et la moelle osseuse et se caractérise par un tapis d'ostéoblastes et d'ostéoclastes jouant un rôle déterminant dans la régulation de l'équilibre de résorption et la fabrication osseuse. Plusieurs études ont ainsi montré *in vitro* et *in vivo* que la modulation du nombre d'ostéoblastes (leur stimulation par facteurs de croissance ou l'inhibition de leur activité) est corrélé avec le nombre de CSH[133,134]. La niche endostéale a pour rôle principale de retenir les CSH dans la moelle osseuse afin de maintenir leur état de quiescence et leur renouvellement[135,136]. Ce recrutement se fait par chimiotactisme *via* la production de chimiokines CXCL12 (dite aussi SDF-1) repérée par les récepteurs CXCR4 exprimés à la surface des CSH.

La niche sinusoïdale

La niche sinusoïdale est composée des autres éléments présents dans la moelle osseuse et permettant la régulation de la différenciation des CSH vers les progéniteurs, et le transport des cellules matures dans le sang périphérique. Les cellules mésenchymateuses et endothéliales qui la composent vont mobiliser les CSH *via*

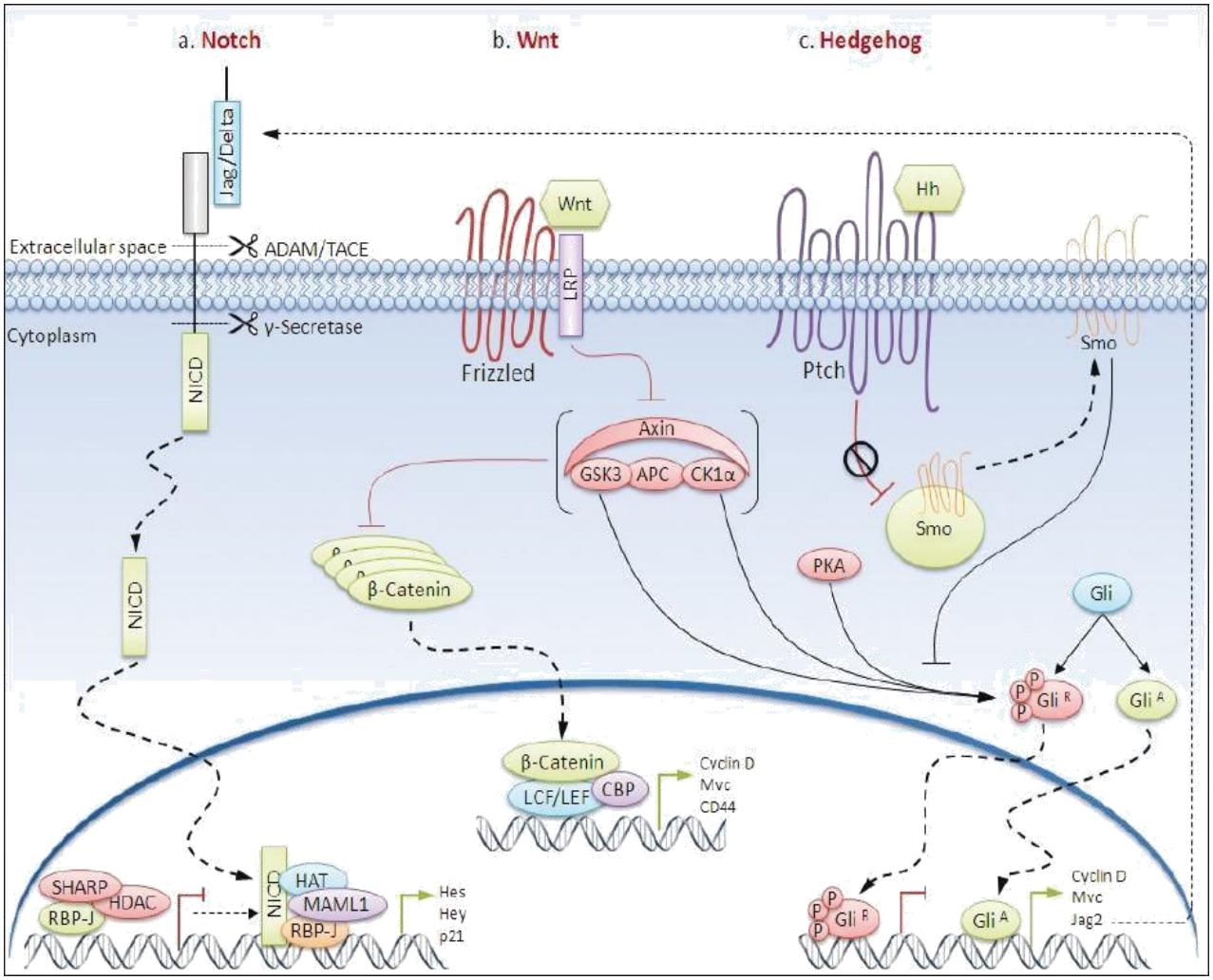


Figure 10. Récapitulatif des différentes voies de signalisations régulatrices de l'autorenouvellement et de la quiescence des CSH

(Malhotra et al., 2011)

chimiotactisme (CXCL12) mais aussi par interaction directe entre les récepteurs VCAM-1 et ICAM-1[123,134]. Kiel et al. a ainsi démontré que la niche sinusoïdale est la plus enrichie en nombre de cellules souches (environ 80%) alors que seulement 20% sont mobilisées dans la niche endostéale[137]. D'autre part, les cellules mésenchymateuses et endothéliales jouent un rôle de promotion de la quiescence des CSH par la production de la glycoprotéine *Angiopoietin-like protein 3* (Angptl-3), favorisant la répression du facteur Ikaros pro-différenciant [138,139]. La prolifération des CSH est également assurée par l'intermédiaire de la E-selectine[137]. L'ensemble de ces éléments est en faveur d'un rôle des cellules dans le maintien de l'hématopoïèse, et plus particulièrement la régulation de l'équilibre en l'auto-renouvellement et prolifération des CSH[137].

Autres cellules de la niche

Dans ces différentes niches résident également d'autres types cellulaires impliqués dans la régulation de la CSH. On peut ainsi citer les macrophages jouant un rôle dans la régulation de l'expression de facteurs pro-quiescent comme le CXCL12, le SCF et Angiopoiétine-1 des niches endostéales et sinusoïdales[114,123,133]. Les adipocytes permettent également de soutenir la régulation négative de la différenciation granuleuse et la prolifération[140]. Et enfin, les lymphocytes T semblent déterminants pour la protection des CSH contre les réactions inflammatoires et autoimmunes[141]. Le système nerveux sympathique intervient également dans la régulation de la niche hématopoïétique à travers des cellules non hématopoïétique (les cellules de Schwann non-myélénisantes) capables de réguler la quiecence des CSH autour de la niche sinusoïdale *via* des intéractions entre intégrines[142].

b. *Voies de signalisations régulatrice de l'autorenouvellement et de la quiescence*

Trois voies fondamentales sont aujourd'hui décrites comme importante dans le maintien de l'état souche de la CSH[143] (figure 10).

Plusieurs publications démontrent d'abord le rôle fondamentale de la voie Sonic Hedgehog (sHh) dans le maintien et la régénération des tissus adultes [143 144]. Les proteins Hh sont produites dans la moelle osseuse et viennent se fixer sur les récepteurs patched 1 et 2 (Ptch1/2). En absence de fixation, le récepteur Ptch empêche

la protéine Smo d'être recruter à la membrane. A la fixation, cette inhibition est levée, Smo est recruté, et peut activer les facteurs de transcription activateurs de gènes essentiels à la quiescence comme Gli.

La voie Wnt/β-caténine est la seconde voie de régulation majeure dans la CSH. Wnt est une glycoprotéine fortement exprimée dans la moelle osseuse.
L'intéraction entre les protéines de la famille Wnt (1, 3a, 5a et 1b) et leur co-récepteur frizzled (Fz)-LRP5/6 permet de lever la séquestration cytoplasmique de la protéine b-caténine, lui permettant d'activer ses gènes cibles régulateurs du cycle cellulaire et de l'apoptose (c-myc, c-jun et cyclines)[145].

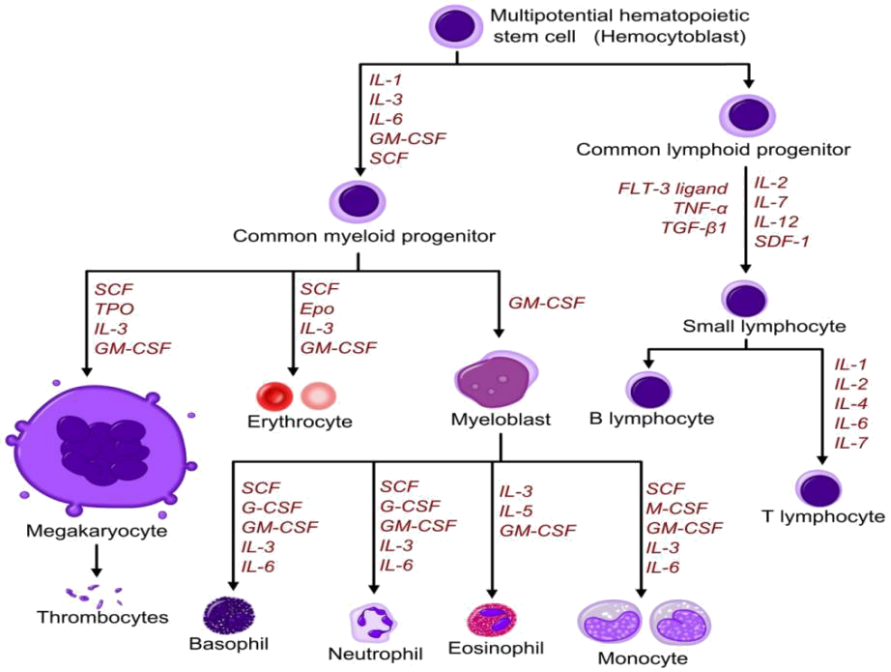
Enfin, la voie Notch est fréquemment décrite comme importante dans le maintien des propriétés de la CSH. L'activation de récepteur transmembranaire Notch est régit par son intéraction avec la protéine Jagged, secrétée dans le microenvironnement médullaire par les CSH[146]. Cette interaction conduit à la libération par protéolyse du domaine cytoplasmique intracellulaire de Notch, adressé au noyau pour contribuer à la régulation de gènes cibles impliqués, entre autres, dans la régulation du cycle cellulaire. Cependant, l'importance de cette voie reste encore aujourd'hui débattue. En effet, les études de Calvi et al. et de Varnum-Finney et al. montrent que l'activation de la voie Notch contitue un message d'inhibition de la différenciation cellulaire[146]. Ces résultats sont cependant contradictoires avec les études de Mancini et al. et de Maillard et al. ouvrant encore aujourd'hui le débat sur la réelle implication de cette voie de signalisation[147].

2. Régulateurs intrinsèques et extrinsèques de l'hématopoïèse

La régulation de la différenciation de la CSH est régie par différents types de facteurs tels que des facteurs extrinsèques (extracellulaires) et intrinsèques (intracellulaires).

Les facteurs extrinsèques sont définits par l'ensemble des molécules secrétées dans le microenvironnement médullaire et perçues par la CSH *via* leur intéraction avec leurs récepteurs spécifiques. La niche est d'abord soumise à gradient de diminution de la concentration d'oxygène des vaisseaux sanguins vers l'os[148]. Ce contexte hypoxique permet à la CSH d'entrer dans un état de protection vis-à-vis des dommages de l'ADN induits par la production d'espèces réactives de l'oxygène toxiques pour la CSH et critique dans l'activation de leur différenciation[149]. D'autre part, la concentration

a.



b.

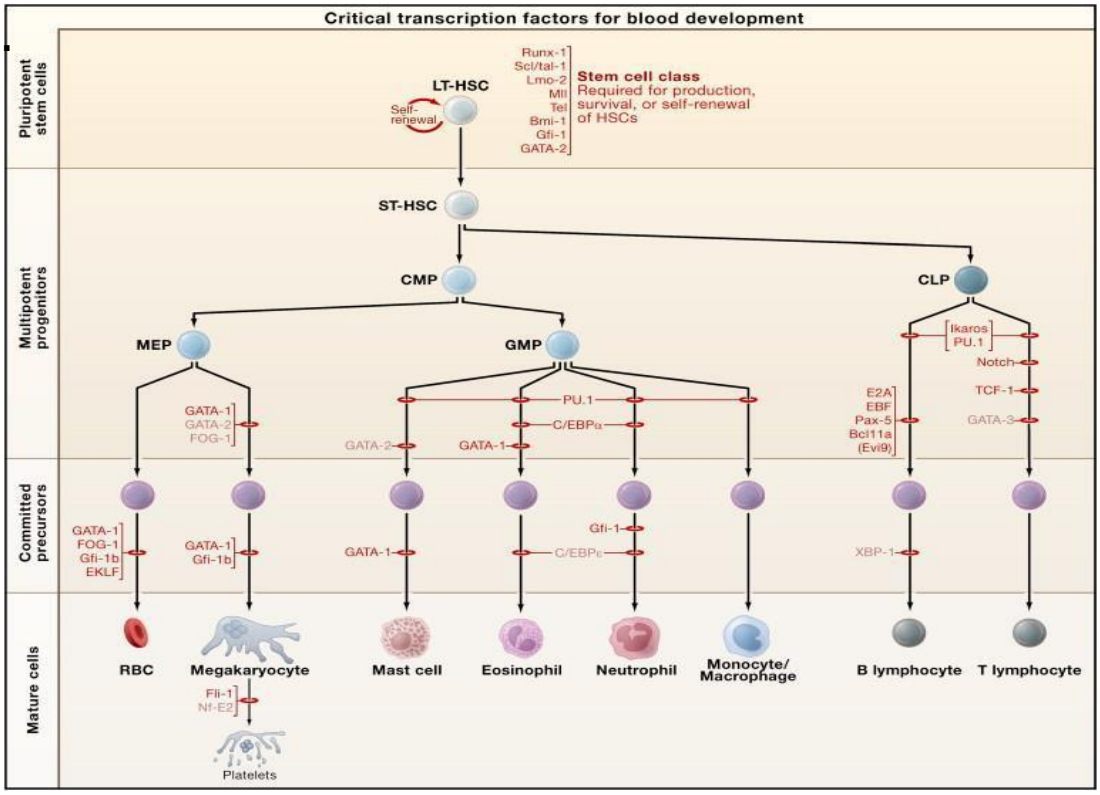


Figure 11. Facteurs de régulations extrinsèques et intrinsèques de l'hématopoïèse

a. Facteurs de régulation extrinsèques : combinaison des principales cytokines régulatrices de la différenciation hématopoïétique.

b. Facteurs de régulation intrinsèques : principaux facteurs de transcriptions régulateurs de la différenciation hématopoïétique.

(Orkin & Zon 2008)

accrue de calcium au sein des niches endostéales permet de réguler l'autorenouvellement osseux à travers l'activation des ostéoblastes/ostéoclastes[150]. Enfin, les facteurs solubles comme les cytokines secrétées par le microenvironnement médullaire vont jouer un rôle déterminant dans l'orientation de la différenciation de la CSH. Les cytokines principales régissant la réponse d'autorenouvellement ou de différenciation ainsi que leurs récepteurs sont résumées dans la figure 11.a.

Les facteurs intrinsèques regroupent quant à eux l'ensemble des gènes et des facteurs de transcription régulés *via* des déterminants génétique ou en réponse à la stimulation des facteurs environnementaux. De la même façon que les régulateurs extrinsèques, ces facteurs vont diriger l'autorenouvellement ou la différenciation en fonction de la combinaison d'activation des gènes cibles dans la CSH (figure 11.b). Parmi les facteurs de transcriptions déterminant dans cette régulation, les facteurs RunX1, Gfi1 et GATA2 constitue les régulateurs principaux de la réponse d'autorenouvellement de la CSH[151]. Cette régulation intervient notamment par la régulation de l'expression des cyclines régissant l'entrée de la cellule dans le cycle cellulaire. Les facteurs de transcription GATA-1 et PU-1 sont quant à eux marqueurs des évènements de différenciation érythroïde, myéloïde et lymphoïde[152]. D'autre part, il est important de préciser que les CSH sont également soumise à différentes régulations épigénétiques au cours de leur activation médiées par l'état de méthylation des promoteurs et des signaux d'acétylation de la chromatine jouant sur l'accessibilité des gènes aux facteurs de transcriptions[153].

IV. Implication des microARN dans la régulation de l'hématopoïèse

Le rôle fondamental des microARN dans la régulation de l'hématopoièse a d'abord été démontré sur le modèle murin. En effet, le ciblage des enzymes cruciales intervenant dans la voie de biogenèse des microARN a notamment montré que le *knock-out* (KO) de Dicer ou l'inactivation conditionnelle des protéines Ago conduisent respectivement à un phénotype létal et à un défaut dans la différenciation hématopoïétique responsable de l'apparition d'une dysplasie [37 154].

L'étude des microARN a donc présenté un grand intérêt afin de comprendre leur rôle d'une part dans le maintien des propriétés de la CSH, mais aussi dans la régulation des voies de différenciation de l'hématopoïèse. L'ensemble de ces analyses se sont alors basées sur des analyses fonctionnelles de ces microARN, ainsi que sur des données de *microarray* permettant d'établir un profil d'expression spécifique à chaque étape de différenciation.

1. Les microARN dans le maintien des propriétés de la CSH

Le profil d'expression microARN propre à la population CSH reste encore aujourd'hui peu décrit. La plupart des analyses utilisant la technologie du *microarray* se focalisent sur le compartiment souche murin permettant un accès plus facile à l'étude des populations LT-CSH et ST-CSH, tandis que les études sur les échantillons humains concernent la population plus hétérogène $CD34^{+}$ [155]. Mêmes si plusieurs études ont permis de mettre en évidence l'expression spécifique de certains microARN entre les différents compartiments cellulaires hématopoiétiques, relativement peu d'entre elles mettent en avant le rôle fonctionnel des microARN identifiés dans la quiescence et l'autorenouvellement. A ce jour, ce sont essentiellement les études de Guo et al., Zhao et al., Wojfowicz et al. et de Roden et al. qui confirment le rôle des miR-125, miR-146 et miR-29 dans le maintien de l'état de quiescence de la CSH[49,156–158].

Le microARN miR-125 a été décrit pour être fortement exprimé dans les CSH alors que son expression diminue avec la différenciation[159]. D'autre part, ce microARN semble également spécifique à la population CSH de long terme humaines et murines, protégeant la CSH *via* la répression de facteurs pro-apoptotique et des acteurs de la voies p53 sans que ses cibles ne soient encore clairement décrites[157].

Zhao et al., montrent également en 2013 que le microARN mir-146a est un régulateur des CSH de long terme. En effet, son KO n'affecte pas les CSH murines sur 6 semaines, mais conduit à terme à une diminution du nombre de CSH et à la mise en place d'un phénotype de désordre myéloprolifératif. Cette régulation semble être dépendante des signaux cytokines perçues dans le micro-envrionnement (IL-6)[158].

Le cas du microARN miR-29 est encore discuté, mais les études de Hu et al., ont clairement montré son rôle dans le maintien de l'état indifférencié de la CSH, à travers

la régulation de DNMT3, régulant ainsi l'état de méthylation de l'ADN[155,159]. La surexpression de ce microARN dans le compartiment souche est également confirmé par les études de Han et al. et Bissels et al., détectant son enrichissement dans les fractions $CD34^{+}CD38^{low}$ et $CD34^{+}CD133^{+}$ chez l'homme[155,159].

Enfin, certains microARN ont la particularité d'avoir leur gène positionné au sein d'un cluster génique activé au cours du développement ou de la différenciation. C'est par exemple le cas du miR-196b, positionné entre les gènes *HoxA10* et *HoxA9,* et dont l'expression au sein de la CSH permet de maintenir l'état indifférenciée de la cellule *via* la répression de l'expression des facteurs HOX pro-différenciants[159]. De la même façon, le cluster miR-17-92 permet de renforcer ce maintien en ciblant directement les acteurs de régulation de l'entrée en cycle cellulaire telle que les cyclines[93].

2. Les microARN régulateurs du microenvironnement médullaire

Nous avons vu précédemment que le micro-environnement médullaire joue un rôle fondamental dans le maintien de la CSH. Il est donc intéressant de noter que certains microARN interviennent également dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules stromales composant la niche hématopoiétique. Plusieurs études ont aini montré que miR-146a semble important pour la régulation positive de la différenciation adipocytaire des cellules mésenchymateuses[160], tandis que miR-125b et miR-196a semblent nécéssaires à leur différenciation ostéogénique[161–163]. Pillai et al. démontrent d'autre part que la regulation des interactions entre la niche et le micro-environnement peut également faire intervenir certains microARN, comme le miR-886-3p, responsable de la régulation de la sécrétion de la chimiokine attractante SDF1 (ou CXCL12) par un ciblage directe de la séquence 3'UTR de son messager[164].

3. Le role des microARN dans la differenciation hématopoiétique

L'activation de la CSH et son entrée dans le processus de différenciation hématopoïétique nécessitent une modulation de l'expression génique propre à chaque lignée hématopoiétique. Certains microARN sont ainsi des régulateurs clés dans l'orientation de cette différenciation myéloïde ou lymphoide.

Parmi les microARN clés de ces régulations, Dore et al. décrivent en 2008 que la différenciation erythroïde induite par le facteur GATA-1 est médiée par la régulation spécifique du *cluster* miR-144/451, marqueur de la lignée rouge[165]. En effet, durant l'erythropoïèse, le facteur de transcription GATA-1 entre progressivement en compétition avec GATA-2, et peut ainsi activer la transcription de miR-144/451. Une fois exprimé, ce microARN réprime l'expression du facteur c-myc, qui ne peut plus activer transcriptionnellement l'expression de GATA-2, contribuant ainsi à déplacer la balance d'expression des facteurs GATA en faveur de la différenciation erythropoiétique. La modulation de l'expression des microARN miR-150 et miR-486 semble également fonctionnelle dans la régulation de la différenciation megakaryopoïétique-erythropoïétique sans que ces mécanismes ne soient clairement identifiés[155,159,166].

L'étude de Vian et al., montrent enfin que le microARN miR-223 semble important dans l'orientation de l'hématopoïèse vers la différenciation granulocytaire. En effet, ce microARN est régulé suite à l'activation spécifique du facteur de transcription C/EBPα au cours de la granulopoïèse[167]. Le rôle de miR-223 est alors de réguler négativement l'expression de facteurs erythrocytaire pour conduire une différenciation granulocytaire.

L'ensemble de ces études met donc clairement en avant le rôle majeur des microARN comme intervenants clés de la régulation de l'hématopoïèse. Cependant, il est important de noter que ces régulations ne sont pas encore aujourd'hui clairement décrites, et que des données restent encore à explorer dans ce contexte complexe de balance entre le maintien des propriétés de quiescence/autorenouvellement de la CSH et sa différenciation.

Chapitre 3

La leucémie myéloïde chronique, un modèle d'étude de la cellule souche cancéreuse

Il est actuellement admis que les cancers répondent majoritairement à un modèle de développement du cancer dit « hiérarchique »[168]. Cette hypothèse suggère que le cancer provient de la transformation d'une cellule souche devenue cancéreuse. Une cellule initiatrice est donc le moteur d'un développement cellulaire pathologique qui devient hétérogène en raison des différentes phases d'arrêt de différenciation dues aux interactions avec le microenvironnement tumoral[168]. Tout comme la CSH normale, la CSH de LMC (CSH-LMC) se caractérise par ses propriétés d'autorenouvellement et de différenciation en toutes les cellules spécialisées de son compartiment[169]. Dans ce modèle, les rechutes de cancers sont donc expliqués par la persistance de ces cellules initiatrices et à leur insensibilité aux traitements[170]. Grimwade & Enver et Dick et al. sont les premiers à démontrer clairement que la leucémie est une maladie touchant la cellule souche et donc répondant à ce modèle hiérarchique[171,172]. En effet, les greffes d'une sous-population de cellules souches isolée à partir de ses marqueurs de surface ont permis de démontrer que la leucémie est une pathologie cellulaire hétérogène, caractérisée par une population cellulaire avec des propriétés prolifératives variables, dont seules un petit nombre est capable d'initier la maladie de nouveau après greffe secondaire. L'un des problèmes majeurs de la LMC actuellement est l'insensibilité de ces CSH-LMC aux traitements actuellement utilisés, conduisant à la rechute des patients vers des formes plus agressives de la maladie lors de son évolution[170]. La caractérisation de ces cellules initiatrices est donc cruciale pour faire évoluer au mieux les traitements actuels, vers des traitements réellement curatifs.

I. La leucémie myéloïde chronique (LMC)

1. Généralités

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une hémopathie maligne clonale acquise touchant la cellule souche hématopoïétique médullaire se caractérisant principalement par une prolifération incontrôlée des cellules granulocytaires. Cette maladie se classe parmi les syndromes myéloprolifératifs au même titre que la maladie de Vaquez (excès d'érythrocytes), la thrombocytémie essentielle (excès de plaquettes) et la myélofibrose primitive (fibrose de la moelle osseuse)[173–175].

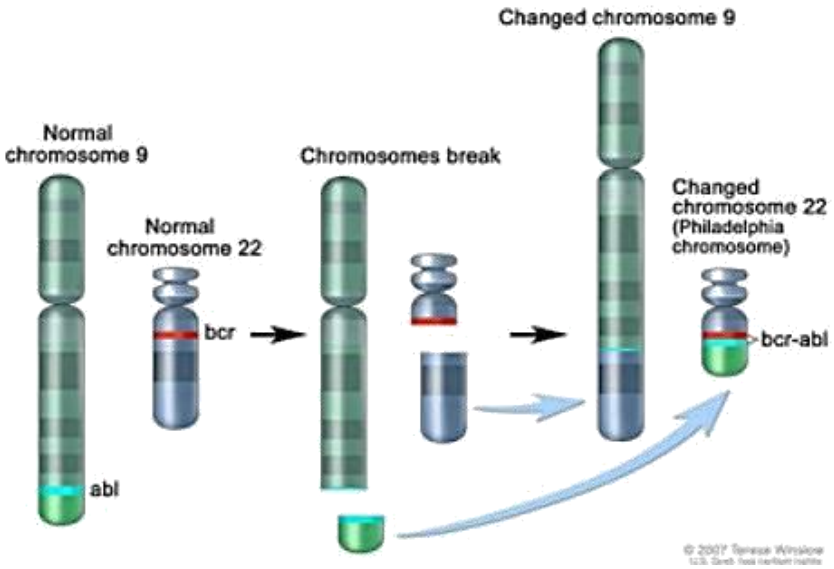
La LMC touche en moyenne une personne sur 100.000 par an avec un âge médian de 55 ans, et touche plus les hommes que les femmes (1.5-1). Elle représente environ 15% des cas des leucémies du sujet adulte. En dehors des expositions aux radiations ionisantes, aucun lien clair n'a encore été identifié entre le développement de la maladie et des facteurs de prédispositions ou environnementaux cancérigènes classiquement décrits (tabac, alcool) [173–175].

2. Phases d'évolutions de la maladie

La LMC est une maladie multiphasique caractérisée par trois étapes d'évolution :

- La phase chronique (PC) : Les patients sont diagnostiqués au cours de cette première phase dans 90 à 95% des cas[173–175]. Au-delà de la prolifération excessive de granulocytes, les symptômes associés à la LMC-PC sont la fatigue, l'anémie, une splénomégalie, des infections épisodiques et des désordres abdominaux, bien que certains patients puissent être asymptomatiques. Les patients sont aujourd'hui bien pris en charge à ce premier stade, puisqu'ils répondent généralement bien aux traitements[173–175].
- La phase d'accélération (PA) et crise blastique (CB) : En absence de traitement ou lors de l'acutisation de la maladie, la progression de la phase chronique vers des formes plus agressives peut s'opérer entre trois et cinq ans[173–175]. Ces deux dernières phases sont liées puisque la PA correspond à une phase intermédiaire entre la phase chronique et la phase d'acutisation de la maladie, la phase blastique. Elle se caractérise par une expansion de plus en plus massive des

a.



b.

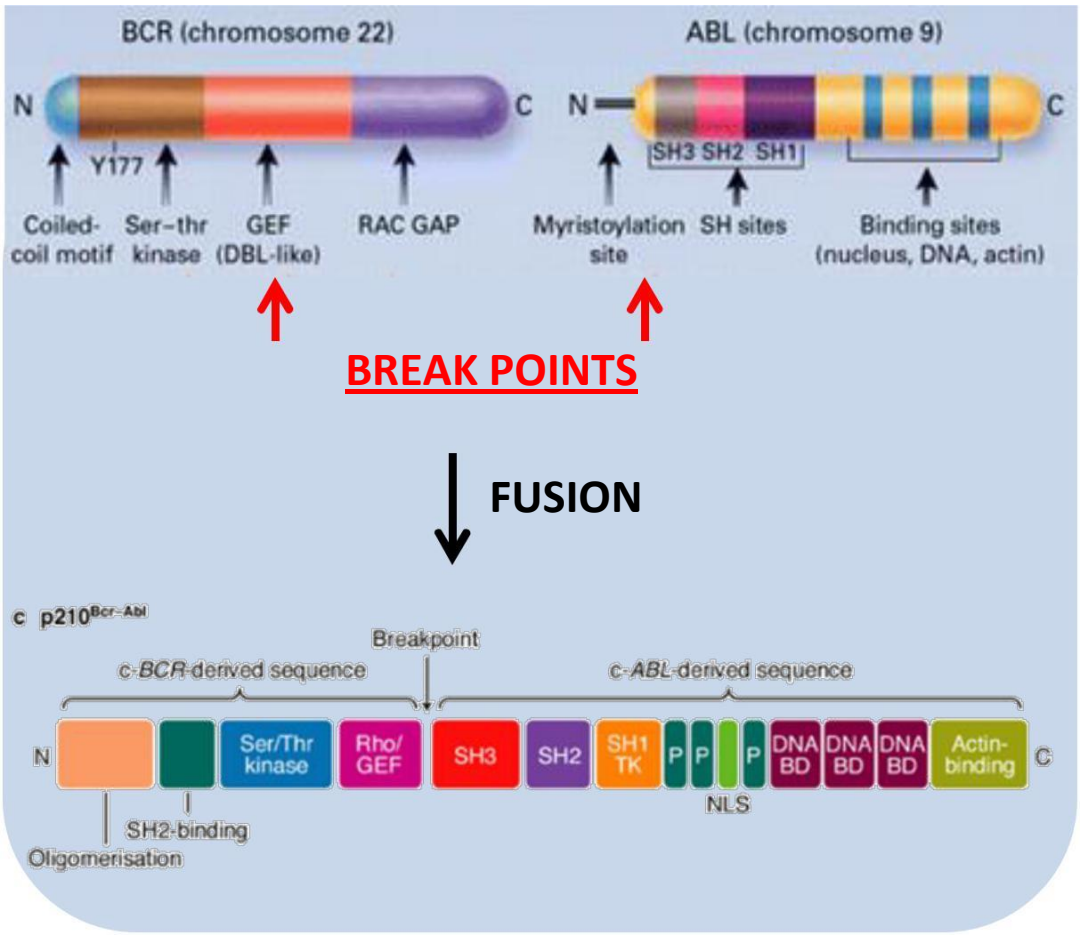


Figure 12. La protéine de fusion BCR-ABL1

a. Translocation chromosomique conduisant à **l'apparition** du chromosome *Philadelphie* portant le gène de fusion BCR-ABL1

b. Structure protéique des protéines BCR et ABL1 (haut) et conservation de leur domaines dans BCR-ABL1 (bas)

(Faderl et al., 1999)

progéniteurs leucémiques dans la moelle osseuse et à une fuite (10 à 20%) dans le sang périphérique cellules bloquées dans leur différenciation que l'on appelle des blastes[173–175]. Les causes de ce blocage ne sont pas encore relativement bien connues à ce jour bien qu'il puisse s'expliquer par l'apparition d'anomalies cytogénétiques et l'activation de voies oncogéniques cellulaires additionnelles[173–175]. La CB est létale en quelques mois pour les patients qui présentent des symptômes d'infections, de thrombose et d'anémie dûs à l'accumulation de blastes dans la moelle osseuse causant d'importantes cytopénies [173–175].

Le programme d'information scientifique européen *European LeukemiaNet* résume les conditions de diagnostic des différentes phases de la LMC dans le tableau 4.

3. BCR-ABL1, la protéine de fusion centrale dans la LMC

La LMC se caractérise par l'apparition du chromosome *Philadelphie* au sein de la cellule souche hématopoïétique. Ce chromosome anormal issu de la translocation réciproque t(9;22)(q34;q11) entre les chromosomes 9 et 22 est isolé pour la première fois en 1960 par David Nowell et Peter Hungerford[173–175] (figure 12.a). Cette translocation conduit à la juxtaposition du domaine N-terminal de la protéine BCR et de la partie C-terminale de la protéine ABL1conduisant à expression d'une protéine de fusion à activité tyrosine kinase constitutive, BCR-ABL1.

a. *La fusion des domaines des protéines BCR et ABL1*

Le gène *ABL* positionné sur le chromosome 9 contient 11 exons. Les deux isoformes issues de son épissage alternatif (ABL1a et ABL1b) conduisent à une protéine de 145 kDa à activité tyrosine kinase, sans activité de récepteur, exprimée de façon ubiquitaire[173–175]. Les différents domaines la composant sont résumés figure 12.b. Elle semble jouer un rôle majeur dans la régulation du cycle cellulaire, la gestion de la réponse à un stress genotoxique et la transmission de l'information de l'environnement cellulaire issue des intégrines[173–175]. En position N-terminal, les isoformes 1a et b se distinguent par un domaine de myristoylation[176,177]. Le domaine SH3 permet la régulation de phosphorylation négative de la protéine par interaction avec les domaines riches en proline (PxxP) et d'autres protéines régulatrices de la famille Abi. La régulation de son activité dépend alors des phosphorylations des

tyrosines 243 et 412. Le domaine SH2 permet d'interagir avec les résidus tyrosine kinases phosphorylés d'autres protéines alors que le domaine SH1 est un site catalytique de phosphorylation important pour la transduction du signal. En position C-terminal, des sites de localisation montrent que ABL1 peut effectuer une navette entre le cytoplasme et le noyau (sites NLS et NES) [176]. Les domaines d'interaction avec l'ADN suggèrent une
activité facteur de transcription bien qu'à ce jour aucun gène cible direct n'ait été caractérisé. ABL1 semble cependant coopérer avec le facteur p53, ce qui peut expliquer son rôle dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose [173–175].

Le gène *BCR* porté par le chromosome 22 contient 23 exons codant pour la protéine à activité sérine-thréonine kinase BCR (160 kDa), également exprimée de façon ubiquitaire[173–175]. Ses rôles au sein de la cellule restent encore peu clairs à ce jour. Cependant, les différents domaines qui composent sa structure protéique (figure 12.b) suggèrent une fonction principale de transduction du signal. En effet, le domaine N-terminal *coiled-coiled* suggère une capacité de dimérisation particulièrement important pour son auto-phosphorylation au niveau de la tyrosine 177 et l'interaction avec des protéines adaptatrices importantes dans l'architecture de transduction du signal (comme Grb2)[173–175]. Le domaine serine thréonine permet sa régulation négative par des protéines inhibitrices de type Abi.

La fusion des protéines BCR et ABL1 entraine une cascade d'évènements cellulaires critique en raison de l'architecture des sites conservés de BCR et ABL1[173–175] (figure 12.b). En effet, la conservation du domaine d'oligomérisation de BCR permet l'autophosphorylation de la tyrosine 177, dotant l'oncoprotéine d'une activité tyrosine kinase constitutive. Cette activation aberrante est également maintenue par la perte des sites de régulations négatives normalement présents sur ABL1 (sites de myristoylation et domaine SH3) [173–175]. Cette nouvelle capacité d'autophosphorylation permet alors le recrutement de différentes protéines architectes et l'activation aberrante de plusieurs voies de signalisation critiques pour la transformation de la cellule.

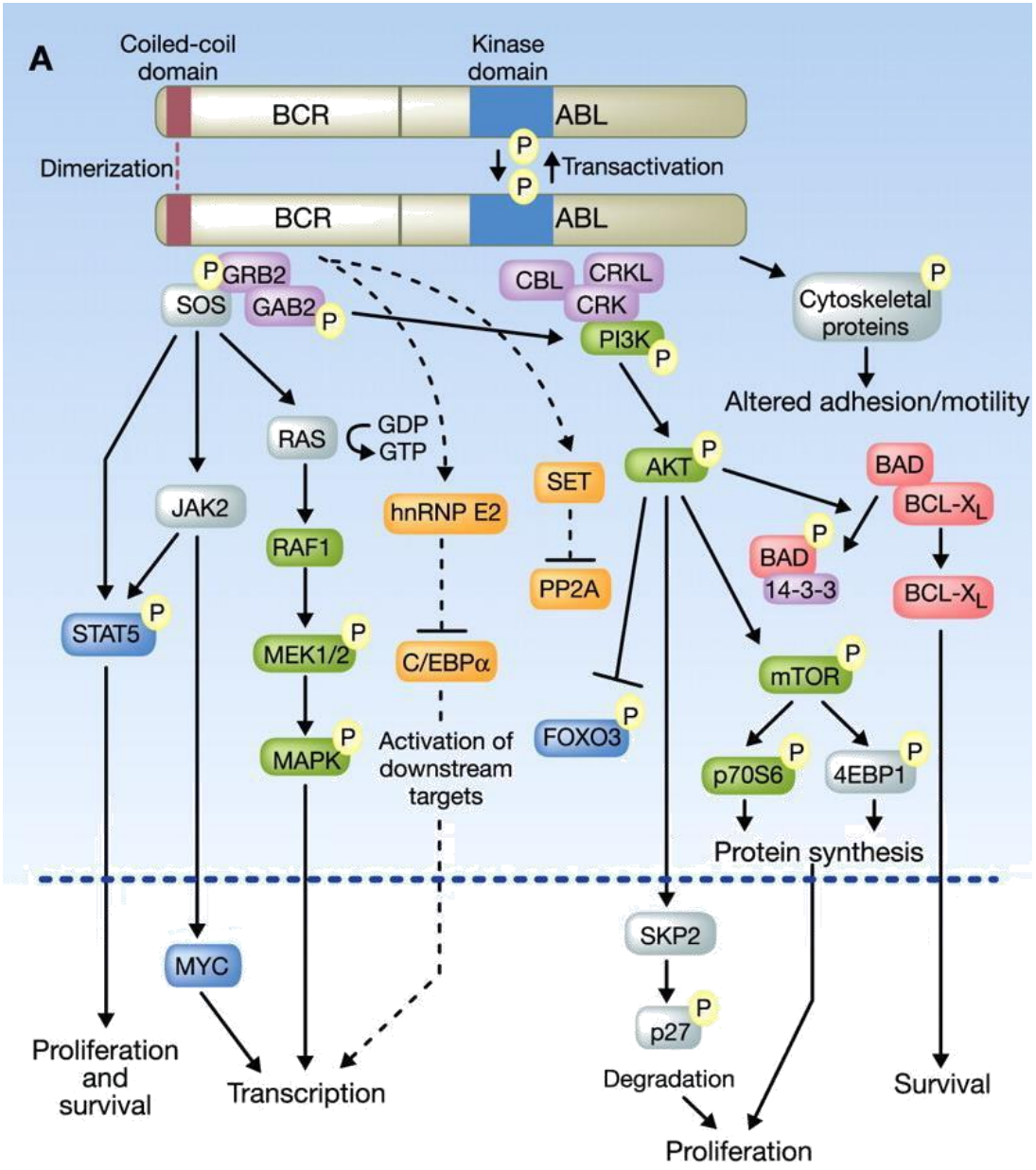


Figure 13. Résumé des voies de signalisation activées par BCR-ABL1

(O'Hare et al., 2011)

II. Effets de l'expression de la protéine BCR-ABL1

Un des aspects les mieux caractérisés de la transformation BCR-ABL1 est l'activation d'un ensemble de voies mitogéniques. L'activation de ces voies, additionnées à la modification des signaux microenvironnementaux conduisent à un changement du comportement de la CSH.

1. Activation des voies oncogéniques par BCR-ABL1

Les voies mitogéniques sont essentielles au maintien de l'état physiologique de la cellule. En effet, elles sont les gardiennes de la balance entre prolifération et apoptose *via* la régulation de gènes cibles participant par exemple à la régulation du cycle cellulaire. BCR-ABL1 va notamment activer de façon aberrante les voies STATs, RAS/MEK/ERK, PI3K/AKT, dont les dérégulations sont déjà rapportées pour être critiques dans l'oncogenèse dans plusieurs modèles[178,179]. L'activité oncogénique de BCR-ABL1 est également renforcée par la régulation positive d'oncogènes et négative de gènes suppresseurs de tumeurs. L'activation de l'ensemble de ces voies, ainsi que la régulation négative des protéines inhibitrices de BCR-ABL1, confèrent un environnement favorable à la transformation de la cellule. La figure 13 résume l'ensemble de ces voies décrites ci-dessous[178,179].

a. *Les voies STATs*

La famille des facteurs de transcription *Signal transducers and activators of transcription* (STAT) regroupe 7 membres (STAT1-4, 5a, 5b, 6). Leur fonction réside principalement dans leur capacité à se dimériser suite à leur phosphorylation, et à transloquer dans le noyau afin d'activer ou de réprimer l'expression de leurs gènes cibles[180,181]. Leur activation est alors régulée par l'activation des protéines cytosoliques à activité tyrosines kinase JAK (*Janus kinase*), via les récepteurs qui leurs sont associés capables de détecter les cytokines présentes dans le microenvironnement[180,181]. L'acteur majeur dans la voie de signalisation induite par BCR-ABL1 est le facteur STAT5, mis en évidence pour son rôle déterminant dans la survie cellulaire entre autre via la régulation de protéines anti-apoptotiques telles que BCLxl, Mcl1 et pim1, expliquant son rôle critique dans la transformation cellulaire due induite par BCR-ABL1[180,181]. STAT5 normalement activé

par la protéine tyrosine kinase JAK2, cependant, Hanschel et al. montrent en 2005 que BCR-ABL1 est capable, en plus de favoriser l'activité de JAK2, de phosphoryler directement STAT5[182]. Cette étude montre ainsi que l'expression de BCR-ABL1 induit une indépendance des cellules transformées aux signaux cytokiniques. D'autre part, des activateurs parallèles tels que les récepteurs PDGFR ou c-KIT participent à l'activation abérrante de ce facteur de transcripttion STAT5. Samanta et al. Ont d'autre part mis en évidence l'activation additionnelle de JAK2 indépendante de BCR-ABL1 *via* les protéines kinases Lyn particulièrement étudiées pour leur rôle dans les phénomènes de résistances aux traitements de la LMC[183].

b. *La voie RAS/MEK/ERK*

Les proteines GTP-binding Ras sont regroupées au sein d'une famille de trois membres: H-Ras, N-Ras et K-Ras. Leurs voies de signalisation faisant intervenir les acteurs MEK/ERK sont largement étudiées dans la cancérologie notamment pour leurs rôles dans la stimulation de la prolifération. L'autophosphorylation de BCR-ABL1 sur la tyrosine 177 permet la formation d'un complexe entre les protéines d'ancrage de Grb2 et GAB2, pouvant lier la protéine architecte SOS qui stabilise ainsi la forme active de la protéine G monomérique Ras[184,185]. Sous cette forme, les protéines adaptatrices Shc et Crkl peuvent venir activer Ras (également substrats de BCR-ABL1). Cette activation initie une cascade d'activation serine/thréonine kinase mitogen-activated protein (MEK) et extracellular-regulated kinase (ERK) pour activer des gènes cibles impliquées dans la prolifération cellulaire et la gestion de la réponse apoptotique *via* une intéraction inhibitrice avec la protéine pro-apoptotique Bad[184,185].

c. *La voie PI3K/AKT*

La voie PI3K/AKT est une voie de transduction de signal classique pour les signaux environnementaux, permettant de moduler différents facteurs de transcriptions ainsi que la survie des CSH-LMC en inhibant leur réponse apoptotique[185]. La protéine PI3K et son effecteur AKT sont activés par BCR-ABL1 grâce à une interaction médiée par les protéines adaptatrices Grb2/Gab2 et CBL[185]. L'activation accrue de cette voie a donc largement été rapportée, et des études comme celle de Diaz-Blanco ont ainsi

démontré son rôle dans la réponse anti-apoptotique et la survie de la CSH-LMC *via*, respectivement, la répression de facteurs comme IRF8 et l'induction de facteurs tels que HOXB4[186]. D'autre part, Jagani et al. démontrent en 2008 son implication dans la stimulation de la voie mTOR conduisant à la régulation du facteur de transcription FoxO impliqué dans la régulation de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose (Bim, Bclxl, cyclines D)[187]. Enfin, il est important de noter qu'AKT est directement capable d'interagir avec le facteur pro-apoptotique Bad, empêchant ainsi d'induire le relargage du cytochrome c par la mitochondrie[185].

d. *Régulation des oncogènes et suppresseurs de tumeurs p53 et c-myc par BCR-ABL1*

Myc est un oncogène surexprimé dans de nombreux cancers. Peu de données sont actuellement répertoriées concernant le mécanisme d'activation de c-myc et la description de ses gènes cibles. Cependant, BCR-ABL1 semble capable de réguler c-myc de façon indirecte, *via* les voies de signalisation PI3K et JAK2 mettant également son évidence dans la survie et la régulation de la réponse apoptotique de la cellule transformée[183,185,188].

Peu de données concernent également le facteur de transcription p53 connu pour son rôle de suppresseur de tumeur. Pourtant, bien que ses régulations par BCR-ABL1 restent encore complexes et mal décrites, l'étude de Copland & Irvine ont largement mis en avant son rôle fonctionnel dans la survie des CSH-LMC au même titre que c-myc[143,185,188]. Cette étude a notamment mis en évidence par analyse transcriptomique que leur expression est régulée au cours de l'évolution de la maladie vers sa phase blastique démontrant leur rôle important bien que mal décrit encore aujourd'hui.

e. *Inactivation des protéines inhibitrices de BCR-ABL1*

La régulation de l'expression des protéines capables de réguler négativement l'activité ou l'expression de BCR-ABL1 est notamment rapportée dans les cas d'évolution de la maladie vers sa phase blastique. La sous-expression des phosphatases PP2A[189], et des protéines inhibitrices Abi1/2 médiant la dégradation de BCR-ABL1 *via* le protéasome permet de maintenir l'activité de l'oncoprotéine et de favoriser la transformation de la cellule en échappant à ses mécanismes de

protection[173,175].

2. Modification des propriétés cellulaires

Comme nous venons de le voir, les différentes voies de signalisations induites par BCR-ABL1 ont clairement un impact sur le métabolisme de la cellule et la modification de ses comportements cellulaires. Ces modifications sont globalement relatives à la régulation de la réponse apoptotique, mais altère également les propriétés de la cellule souche hématopoïétique ainsi que son intéraction avec le microenvironnement.

a. .*Suppression de la réponse apoptotique*

Le mécanisme d'action de BCR-ABL1 joue de façon très importante sur la régulation de la réponse cellulaire précoce à l'apoptose par la perméabilisation de la membrane mitochondriale et le relargage du cytochrome c. Ce mécanisme d'apoptose est régit par les membres de la famille Bcl2 constitué de protéines pro-apoptotiques tels que Bad, Bid, Bim ou Bax et anti-apoptotique tels que Bcl-2 et Bcl-xl[173]. La régulation de la réponse apoptotique va dépendre d'une part de la balance d'expression de chacune de ces protéines mais aussi de leur interaction par hétérodimérisation afin d'empêcher les protéines pro-apoptotiques de se lier à la membrane mitochondriales et de procéder au relargage du cytochrome c [173]. Comme nous l'avons vu, ces voies sont largement régulées par la quasi-totalité des voies décrites précédemment. En effet, STAT5 contribue à la surexpression du facteur anti-apoptotique Bcl_{xl}, tandis que la phosphorylation de Bad par PI3K/AKT et la voie RAF facilite sa localisation exclusivement cytoplasmique, l'empêchant de jouer son rôle pro-apoptotique dans la mitochondrie bloquant ainsi la réponse apoptotique dépendante de l'activation de la voie des caspases[173]. Ces mécanismes participent alors à la survie de la CSH-LMC, mais aussi indirectement à sa prolifération.

b. *Altération du recrutement et de l'adhésion des CSH-LMC*

L'interaction cellulaire entre les cellules progénitrices et le microenvironnement médullaire sont indispensables pour le maintien des propriétés de quiescence de la CSH. Les intégrines sont les protéines indispensables à ces

interactions. Ces glycoprotéines sont des récepteurs de surfaces composées de 2 sous-unités alpha (transmembranaire) et beta (impliquée transduction du signal). Les progéniteurs LMC semblent exprimer un variant de la forme beta conduisant à une transduction du signal et une adhésion défectueuse[190,191]. Plusieurs études, notamment transcriptomiques, ont également montré le rôle important des voies PI3K/AKT et du marqueur de surface CD44 dans la réception d'un message de motilité cellulaire augmentée dans la CSH-LMC[186,192]. Dans ce cas, les cellules stromales n'ont plus de contact avec les CSH-LMC et ne peuvent plus induire de signal de répression de la prolifération. Enfin, l'ensemble de ces régulations est logiquement dépendant d'un signal altéré du recrutement des CSH-LMC au sein de la niche afin d'en assurer le maintien des propriétés biologique. Jin et al. démontrent en 2008 que le signal de chimiotactisme *via* CXCR4 est largement activé dans la niche de la LMC, et semble contribuer à la protection de l'exposition des CSH-LMC aux ITK, puisque leur ciblage moléculaire permet de restaurer une sensibilité des cellules aux traitements[193]. Le contexte moléculaire de la niche est donc modifié pour permettre un équilibre entre recrutement, et mise en quiescence des CSH-LMC tout en dirigeant la prolifération massive des progéniteurs essentiels au développement de la maladie.

c. *Quiesence et autorenouvellement*

La voie Hedgehog est une des voies indispensable au maintien des propriétés d'autorenouvellement et de quiescence de la cellule souche. Dierks décrit en 2008 que son effecteur principal, Smo est largement activé dans les CSH-LMC et importante dans la progression de la maladie puisque son KO dans le modèle murin permet d'endiguer le phénotype leucémique[194]. Zhao et al. ont également confirmé cette observation sur des échantillons de patients LMC, démontrant également qu'elle est participe dans l'évolution de la maladie vers la crise blastique[114]. La deuxième voie indispensable dans ce maintien, est la voie Wnt/b-caténine, elle aussi rapportée pour être activée de façon aberrante dans les CSH-LMC. De la même façon que pour la voie Hh, sa surexpression est également critique dans la progression de la LMC, dans laquelle elle participe clairement au développement de la crise blastique[195]. Egalement associée au contexte de résistance chez les patients LMC, cette voie demeure alors indispensable au maintien et à la persistance des CSH-LMC puisque l'inhiber dans des modèles conduit clairement à une régulation de la progression de la maladie[196].

3. Marqueurs de surface spécifiques

Les études relatives à la caractérisation des marqueurs potentiels des CSH-LMC se sont d'abord focalisées sur la comparaison des compartiments $CD34^+$ LMC par rapport aux sujets sains, alors que ces populations même restent encore extrêmement hétérogènes et faiblement enrichies en CSH. Dès 2013, les avancées technologiques ont permis l'utilisation de marquage des CSH en fonction de leurs protéines de surface, ainsi que la maitrise des nouvelles technologies transcriptomiques ont permis de lever cette limite technique pour proposer des études comparatives sur des compartiments de plus en plus enrichies en CSH.

Très peu d'études à ce jour ont de ce fait été effectuées dans le contexte de la LMC, et actuellement, seules trois publications font état de la découverte de potentiels marqueurs de surface des CSH-LMC. Ces trois dernières années ont donc été marquées par les travaux des équipes de Herrman et al., Kinstrie et al. et Gerber et al. faisant état de la surexpression des marqueurs de surface CD25, CD26, CD93 et IL1RAP dans les CSH-LMC[197–199].

Dans un premier temps, l'étude de Gerber et al. met en évidence en 2013 la surexpression des protéines CD25, CD26 et IL1RAP et propose leur possible rôle fonctionnel dans la régulation de la différenciation cellulaire[199].

Cette étude est ensuite complétée par les deux publications de l'équipe de Herrman, qui montre que les cellules CD25 et CD26 positives représentes environ 70% des CSH $BCR\text{-}ABL1^+$ [197,200]. Ces marqueurs ne semblent pas différenciant des phases d'évolution de la LMC, mais demeurent important dans les processus de survies de la CSH-LMC, de sa prolifération et de sa réponse apoptotique réduite. Un lien potentiel entre BCR-ABL1 et l'expression de CD25 semble dans ces études compte tenu de la mise en évidence de la régulation transcriptionnelle de CD25 par STAT5. En revanche, aucun lien clair n'a été décrit concernant CD26. D'autre part, la surexpression du marqueur de surface IL1RAP a été démontré dans ces trois études, mais n'a pas fait l'objet d'études fonctionnelles à ce jour.

Enfin, l'équipe de Kinstrie a proposé plus récemment que la protéine CD93 semble être un marqueur plus que cohérent pour les CSH-LMC[198]. En effet, ces données se basent sur la présentation de ses résultats non publiés pour l'instant mais seulement présentés dans un congrès. Ceux-ci montrent que les populations de CSH-LMC

surexpriment le marqueur CD93, et que 100% des cellules $CD34^{+}CD93^{+}$ sont des cellules ayant des propriétés souches et portant l'oncogène BCR-ABL1.

L'ensemble de ces données constituent une avancée majeure dans le domaine de la caractérisation des CSH-LMC, ouvrant la voie à des études potentielles sur des populations de plus en plus pures en CSH portant l'oncogène BCR-ABL1.

III. Implication des microARN dans la leucémogenèse

Nous avons vu dans le chapitre 1 que les microARN sont aujourd'hui considérés comme des acteurs majeurs des processus oncogéniques en qualité d'oncogènes ou de suppresseurs de tumeurs. D'autre part, dans le chapitre 2, la revue de la littérature actuelle montre une implication claire des microARN dans la régulation de l'hématopoïèse et des voies métaboliques de la CSH. C'est donc tout naturellement que se justifie l'intérêt d'étudier leur implication dans l'oncogenèse d'un modèle de cancer de la cellule souche tel que la LMC. En effet, l'apparition de BCR-ABL1 constitue un évènement critique dans la transformation de la CSH, mais le maintien de cette transformation n'en demeure pas moins dépendant des autres voies de signalisations parallèlement activées. Les microARN sont donc de potentiels acteurs complémentaires dans les mécanismes de la leucémogenèse.

1. Les microARN surexprimés dans la LMC

La surexpression des microARN dans le contexte leucémique suggère leur activité potentiellement oncogénique. Les récentes études d'analyses par *microarray* ont montré qu'à ce jour un petit nombre de microARN sont surexprimé dans la LMC. Parmis les plus rapportés, on retrouve les microARN oncogénique décrits dans le chapitre précédent, mir-17-92, miR-21 et miR-155.

Le cluster miR-17-92 est le mieux caractérisé dans la LMC. Sa surexpression a d'abord été démontrée par Venturini et al en 2007 sur des lignées modèles de LMC[201] et confirmé plus tard dans l'étude Fallah et al. dans les prélèvements de sang périphérique de patients LMC[202]. La question de sa surexpression comme marqueurs de l'évolution de la LMC vers la crise blastique reste encore à clarifier compte tenu des résultats contradictoires rapportés à ce sujet[202,203]. D'autre part, l'analyse par

microarray de Jurkovicova et al. en 2015 suggère que son expression est d'autant plus forte chez les patients résistants aux ITK[108].

Les microARN miR-21 et miR-155 sont reconnus pour être des oncogènes dans plusieurs modèles[95]. Cependant, très peu d'études à ce jour se sont focalisées sur leur rôle potentiel dans la leucémogenèse. En effet, les analyses de Machovà et al. effectuées sur des échantillons de sang périphérique de patients LMC résistants et répondeurs montrent que leur surexpression semble associée à la réponse de résistance aux traitements ITK[203]. Quelques études suggèrent d'autre part que leur surexpression semble importante pour la survie des cellules LMC[83,204].

2. Les microARN sous-exprimés dans la LMC

L'utilisation de la technologie d'analyse du niveau d'expression de microARN par *microarray* a notamment permis de mettre en évidence trois cas de sous-expression de microARN dans la LMC.

Plusieurs études démontrent d'abord clairement par miRT-qPCR et analyses *microarray* que le miR-150 semble sous-exprimé dans les cellules primaires de patients LMC en phase chronique, suggérant un rôle de celui-ci dans la leucémogenèse[202,205]. L'étude de Flamant et al., en 2010 confirme ces données et démontrent également que miR-150 ne constitue pas un marqueur de distinction entre la phase chronique et la phase blastique de la maladie[206]. En revanche, les conclusions fonctionnelles de ces trois études mettent en évidence une possible utilisation du miR-150 comme biomarqueurs de suivi de la réponse aux ITK.

Les résultats de l'étude d'Agirre et al. suggèrent également que miR-10a est sous-exprimé dans 71% des cas de CP-LMC[205]. Cette sous-expression semble corrélée avec l'augmentation de USF2, un facteur de prolifération cellulaire. Son expression aberrante semble par ailleurs associée à l'évolution de la LMC vers sa phase blastique[207]. L'étude de Flamant et al. met d'autre part en évidence un lien de régulation possible entre BCR-ABL1 et miR-10a puisque leur analyse *microarray* montre que son expression est restaurée lors du traitement des patients par les ITK[207].
Enfin, le cas de miR-29a/b est particulièrement intéressant. Majoritairement rapporté pour son rôle dans le maintien des propriétés des CSH, peu d'études montre son rôle potentiel dans la physiopathologie de la LMC[208]. En effet, les travaux de Li et al montrent en 2013 que sa surexpression artificielle dans les lignées de LMC conduit à

un blocage de la prolifération et à une entrée en apoptose des cellules, suggérant son rôle protecteur dans la LMC[209]. D'autre part, San-josé Enèriz et al. et Machòva et al. montrent que la régulation négative de miR-29 semble associée aux profils de patients résistants aux ITK[203,210]

IV. Traitements de la LMC

La LMC est un exemple de pathologie causée directement par l'expression d'un oncogène spécifique au sein de la cellule. Avant la découverte des ITK, l'évolution de la maladie vers sa crise blastique létale était très rapide[211]. Leur découverte à donc été une véritable révolution dans la prise en charge des patients LMC. L'imaitnib est ainsi le premier ITK utilisé pour le blocage de l'activité ATP-dépendante de BCR-ABL1[211].

Cependant, environ un tiers des patients développe des résistances au cours du traitement[211]. Ces résistances peuvent être dépendantes ou indépendantes de BCR-ABL1. Plusieurs autres générations d'ITK comme le dasatinib, le nilotinib, le ponatinib ou encore plus récemment l'erlotinib ont été développés [211–213].

1. Traitements cliniques de la LMC

Jusqu'aux années 2000, les traitements de prédilection de la LMC restaient basés sur l'auto-greffe et les interférons alpha. Mais l'émergence des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) a constitué une révolution dans la prise en charge des patients. Depuis, cinq ITK différents sont utilisés dans le traitement de la LMC (Imatinib, Dasatinib, Nilotinib, Bosutinib et Ponatinib) et utilisés en fonction des conditions de réponse et d'évolution du patient.

a. *Traitements avant la découverte des ITK*

Entre les années 1950 et 1980, les traitements de prédilection de la LMC se basaient sur l'utilisation du busulfan, de l'hydroxyurée et des interférons alpha (IFNa).

Ces traitements permettaient essentiellement des réponses de cytoréduction mais présentaient des problèmes de cytotoxicité non-négligeables. La durée moyenne de la phase chronique était alors d'environ 3 ans, avant d'évoluer vers la phase d'accélération et la crise blastique létale en quelques mois. Les techniques de greffes ont alors été utilisées en parallèle afin de tenter d'améliorer les traitements.

Busulfan et Hydroxyurée

Le busulfan est un agent alkylant qui induit des dommages à l'ADN ce qui le rend préférentiellement cytotoxique pour les CSH[212]. L'hydroxyurée permet quant à elle de réduire la synthèse de l'ADN en ciblant les ribonucléotides diphosphate réductase[212]. La spécificité limitée de ces agents les rendent particulièrement cytotoxiques pour les patients et ne permettent pas de gérer l'évolution en crise blastique de la LMC. Ils sont utilisés de nos jours comme traitements intermédiaires dans le passage d'un ITK à un autre (Hydroxyurée) ou dans la préparation aux allogreffes (Busulfan) [212].

Interféron alpha (IFNa)

L'interféron alpha a été utilisé en clinique depuis les années 1980[212]. Son utilisation a permis d'augmenter l'espérance de vie des patients de façon non négligeable par rapport à l'utilisation des agents busulfan et hydroxyurée[212]. Cependant, il reste peu efficace lors de l'évolution de la maladie vers sa phase d'accélération. Son mécanisme d'action reste encore mal décrits, mais son association avec des agents inhibiteurs de la réplication (comme la Cytarabine) induit une réponse apoptotique des cellules LMC *via* l'activation des récepteurs de mort (FAS) et l'induction de la voie MAPK[212]. De nos jours, cette molécule reste rarement utilisée comme traitement de première intention, et est plutôt utilisée en combinaison avec d'autres ITK dans les cas de résistances non éligibles aux allogreffes.

Les greffes de moelle osseuse

Deux types de greffes de moelle osseuse sont à distinguer dans le traitement de la LMC. L'auto-greffe a d'abord été utilisée en première ligne de traitement dès les années 50 lors des phases d'évolution de la LMC non-traitées efficacement par la chimiothérapie[212]. Le principe est de greffer au patient ses propres cellules souches prélevées à un stade plus précoce de la maladie. L'objectif de cette technique était de ramener le patient vers un stade de la maladie antérieur et contrôlable de nouveau par chimiothérapie. L'allogreffe a permis de faire évoluer cette technique de traitement de la LMC puisqu'elle se base sur un principe de greffe de moelle osseuse à parti d'un donneur sain. Plus efficace que l'autogreffe, elle permet de greffer des CSH non Ph^+.

La lourdeur de ces techniques, les risques de rejet par compatibilité HLA et l'âge moyen des patients LMC en font des techniques de derniers recours, utilisé en cas de réponses réfractaire à l'ensemble des chimiothérapies[212].

b. *Générations d'ITK*

Les inhibiteurs de tyrosine kinase ont présentés une révolution considérable dans les traitements à la LMC dès les années 2000[212]. Ces molécules présentent une structure analogue à l'ATP et leur principe d'action est basé sur une inhibition directe de l'activité de BCR-ABL1 par compétition sur le site de fixation à l'ATP. L'imatinib est l'ITK utilisé en traitement de première ligne mais deux autres générations ont été développées pour répondre aux résistances et à l'hétérogénéité des réponses des patients aux traitements[212]. Ainsi, le dasatinib et le nilotinib sont plus souvent utilisés en traitement de deuxième intention en raison de leur capacité à cibler BCR-ABL1 de façon plus affine et d'autres voies de signalisation activées lors des cas de résistances (SRC kinase, c-kit, PDGFR etc.). Les ITK de troisième génération (bosutinib et ponatinib) sont également utilisés en clinique afin palier à l'inefficacité des autres générations d'ITK sur les mutations de BCR-ABL1 plus agressives[214]. La spécificité de chaque ITK est résumée dans le tableau 5.

c. *Nouvelles thérapies en étude*

Au-delà des traitements cliniques actuels, d'autres approches visent à inhiber les voies de transduction du signal activées de façon aberrantes dans les cellules transformées. Les voies PI3K/AKT et du mTOR ciblées par des inhibiteurs (LY294002, RAD001) sont donc des pistes thérapeutiques additionnelles aux chimiothérapies classiques présentant un intérêt non négligeable[214].

2. Mécanismes de résistances aux traitements

Les ITK ont marqués un tournant majeur dans le traitement de la LMC permettant d'augmenter significativement l'espérance de vie des patients. Cependant, des cas de résistance cliniques peuvent se manifester sous deux formes, les résistances réfractaires et les résistances secondaires, suite au traitement par une modification de la biologie de la maladie.

a. *Résistances dépendantes de BCR-ABL1*

Mutations de BCR-ABL1

Dans 40 à 90% des cas de résistances, la première cause est due à une mutation du gène BCR-ABL1 conduisant à une substitution d'acide aminé au sein de la structure protéique de BCR-ABL1[215]. Plus de 100 mutations ont ainsi été relevé touchant le site catalytique de la protéine. La résistance aux ITKs de premières générations est issu d'une modification de la séquence du site catalytique de BCR-ABL1 permettant toujours la fixation de l'ATP dans la poche enzymatique, mais ne permettant plus à l'ITK de cibler spécifiquement cette zone[215]. Les cas de résistance par mutation du domaine kinase pour les traitements de seconde et troisième génération sont plus rares. En effet, elles dépendent de la modification de conformation du site catalytique en fonction des domaines touchés. Ces mutations conduisent alors à une baisse d'efficacité et de ciblage par ces traitements.

Surexpression de BCR-ABL1

Des amplifications du gène BCR-ABL1 peuvent être détectées chez des patients résistants mais cela constitue aujourd'hui un mécanisme de résistance moins important que celui des mutations. En effet, même si l'augmentation d'expression au sein de la cellule semble jouer un rôle potentiel dans la résistance, les preuves ne sont toujours pas à ce jour clairement évidentes[212].

b. *Résistances BCR-ABL1 indépendantes*

Pompes à influx et efflux de drogues

L'expression des transporteurs membranaires participe à la capacité de la cellule à limiter l'incorporation des ITK ou à les évacuer plus rapidement. Ce mécanisme joue un rôle primordial dans la persistance des cellules leucémique sous deux aspects : d'une part elle permet à la cellule de limiter sa réponse apoptotique et d'autre part, la faible quantité de drogue incorporée permettrait de sélectionner des clones BCR-ABL1 mutés pouvant conduire à des complications de réponses aux traitements par la suite. Ce mécanisme de résistance met donc en avant deux substilités dans la résistance des cellules, non seulement résistante, mais également persistante car insensibles aux traitements[212].

D‘autre part, l‘imatinib est un substrat de la pompe à efflux membranaire PGP/MDR1 dont la surexpression a clairement été montrée comme contribuant à l‘efflux massif de la drogue, baissant considérablement la concentration Imatinib cellulaire et baissant l‘efficacité du traitement. Son gène, *ABCB1* est hautement polymorphique avec 66 SNPs relevé à ce jour[212].

Ces données ne sont pas consensuelles puisque dans le cas du transporteur cationique hOCT1, deux études montrent que sa surexpression permet une meilleure réponse des patients aux ITK alors que deux autres montrent le contraire. Ces études portant sur un faible nombre d‘échantillons ne permettent donc pas de conclure clairement sur son impact, et sur la population cellulaire précise concernée (cellule souches de long terme, ou de court terme).

Malgrès les difficultés à comparer les études entre elles du fait de l‘hétérogénétié de la réponse aux patients résistants, on ne peut à ce jour ni affirmer ces hypothèses, ni les réfuter avec arguments.

Voies de signalisation secondaires

Les voies de signalisations induites par BCR-ABL1 peuvent également être activées indépendamment par d‘autres acteurs émergents au cours de l‘évolution de la LMC.

Parmi ceux-ci, la surexpression de la protéine Lyn (tyrosine kinase appartenant à la famille des SRC) est un exemple concret mis en évidence dans des lignées et des cellules primaires de patients résistants à l‘imatinib. Lyn est une protéine cible phosphorylé par BCR-ABL1 permettant permet de stabiliser le complexe Grb2/Gab2 au niveau de BCR-ABL1 et de maintenir la phosphorylation du résidu Tyr177. Les voies classiques de survie et de prolifération de BCR-ABL1 peuvent ainsi être activées indépendamment de son activité tyrosine kinase propre[212].

La modification des sécrétions des signaux cytokines est également un facteur important dans la voie de résistance indépendante de BCR-ABL1. En effet, la sécrétion massive de GM-CSF relevée chez des patients résistants permet une stimulation autocrine des cellules LMC *via* l‘activation des voies PI3K/AKT/mTOR mais aussi une activation de STAT5 indépendante de BCR-ABL1 contribuant à la survie de la cellule leucémique indépendamment de l‘activité de BCR-ABL1[212]

.

Enfin, les travaux récents de l'équipe de Deininger a démontré un rôle important de STAT3 dans le phénomène de résistances des CSL aux traitements ITK[216]. En effet, cette étude montre que les cellules primaires des patients résistants sous traitement ITK présentent une hyperphosphorylation du facteur STAT3 et qu'une voie parallèle d'activation de STAT3 (IL-6 dépendante) permet de maintenir et de rendre la CSL indépendante à l'inactivation de BCR-ABL1. De façon intéressante, le knock-down de STAT3 dans des lignées LMC résistantes (cultivées dans des conditions environnementales proche de la niche hématopoiétique) les rend à nouveaux sensibles aux ITK. La phosphorylation STAT3 semble alors constituer une voie compensatoire lorsque BCR-ABL1 est inactivé dans les CSH-LMC.

3. La persistance des CSH-LMC chez les patients traités aux ITK

La persistance des CSH-LMC chez les patients traités se confirme lors de l'apparition de rechutes des patients lors de l'interruption de traitements. D'autre part, dès 2007, Jørgensen et al. suggère que ces réponses de persistances des CSH-LMC peuvent s'expliquer par les processus de résistance dépendant ou indépendant de BCR-ABL1[217]. Cependant, le lien entre persistance de la maladie et résistance des CSH-LMC s'est imposé dès 2010 lorsque le groupe de Corbin montre clairement que l'activité de BCR-ABL1 est bien bloquée dans les CSH-LMC puisque ses cibles directes ne sont plus phosphorylées[218].

La persistance des CSH est une réalité qui est toutefois aujourd'hui bien contrôlée grâce aux différents traitements disponibles. Cependant les patients doivent recevoir des traitements longs voire durant toute leur vie, ce qui est associé à des effets secondaires non-négligeables. Les arrêts de traitements sont possibles et constitue un des sujets de recherche de notre laboratoire[219,220]. Mais il n'en reste pas moins qu'une meilleure connaissance de la biologie de la CSH-LMC reste nécessaire à l'amélioration de la prise en charge de cette maladie.

Conclusion

La LMC est une maladie de la cellule souche hématopoiétique caractérisée par l'apparition de l'oncoprotéine BCR-ABL1. L'activité tyrosine kinase accrue de cette protéine bouleverse l'équilibre physiologique de la cellule *via* l'activation de plusieurs voies de signalisation nécessaires à l'équilibre apoptotique et prolifératif des cellules. La LMC est un modèle remarquable en oncologie pour plusieurs raisons. D'une part, aucun facteur environnemental ou génétique ne permet à ce jour de prédire l'apparition de la maladie contrairement à d'autres modèles. D'autre part, l'origine clonale de la maladie ainsi que son évolution multiphasique en font un modèle de démonstration de la théorie moléculaire du « multi-évènement » dans le développement du cancer. Enfin, l'apparition de la maladie causée principalement par l'expression de l'oncogène BCR-ABL1 a permis de développer des thérapies fondée par l'utilisation d'inhibiteurs de tyrosines kinases (ITK) ciblant directement l'anomalie associée au développement de la maladie. Cette avancée amène à considérer la LMC comme un véritable modèle du succès des thérapies ciblées qui, au-delà d'augmenter efficacement l'espérance de vie des patients, a également permis de mieux comprendre les mécanismes d'action de BCR-ABL1 et de mettre en évidence les différents acteurs relatifs à ses mécanismes. Cependant, les rechutes rapportées pour environ 30% des patients et de manière plus générale la persistance des CSH-LMC rest un véritable enjeu.

Ce projet de thèse propose de compléter les connaissances relatives aux mécanismes cellulaires de BCR-ABL1 et aux propriétés des CSH de LMC. Notre intérêt s'est particulièrement focalisé sur le rôle potentiel des microARN dans la leucémogenèse. En effet, ces petits ARN non-codants ont largement été décrits dans le contexte physiologique mais aussi dans des contextes physiopathologiques, comme les cancers. D'autre part, leur rôle déterminant dans l'hématopoièse et les nombreuses études suggérant des dérégulations de l'expression de plusieurs microARN dans la LMC justifient que leur rôle dans la leucémogenèse soit encore étudié aujourd'hui.

RESULTATS

PROJET 1

Rôle de l‘axe BCR-ABL1/STAT5/miR-21/PDCD4 dans la LMC

I. Objectif et remise en contexte

Ce premier projet a constitué l'ensemble de mon sujet de stage de master 2 (réalisé en 2013) et a été continué au cours de ma thèse. Cette introduction fait l'état des lieux des connaissances disponibles au début de notre projet.

Comme les chapitres précédents l'ont montré, l'engouement pour l'étude des microARN n'a cessé d'augmenter depuis les années 2000 suite à la découverte de la conservation de leur séquence et de leur fonction entre les vertébrés et les invertébrés. Les études se sont alors multipliées dans plusieurs modèles de cancers, visant à déterminer la place potentielle des microARN dans les processus pathologiques. Dès 2005, les quelques profilages de microARN effectués sur plusieurs modèles de cancers suggéraient la dérégulation récurrente de certains microARN[82,221]. Ces études ont ainsi permis de proposer que certains microARN avaient des fonctions oncogéniques, alors que d'autres étaient suppresseurs de tumeurs[23].

De façon intéressante, seul un petit nombre de travaux concernant la LMC étaient publiés en 2013. Encore aujourd'hui, les études sur l'implication des microARN dans la LMC sont moins nombreuses que celles relatives aux autres types de leucémies telles que les LAM, LAL ou CLL. Les études de Chaubey et al., Agirre et al. et Venturini et al. démontraient par profilage *microarray* que les microARN miR-10a, miR-150, miR-151, miR-199b et miR-219-2 sont sous-exprimés dans la LMC tandis que le microARN miR-17-92 est surexprimé dans des échantillons de $CD34^+$ de patients LMC[201,205,222]. Ces études suggèraient également des liens de régulation d'expression entre ces microARN et l'activité de BCR-ABL1. Plus tard, San José-Enériz et al. identifient également 19 microARN dont l'expression est significativement dérégulée entre les échantillons $CD34^+$ de patients répondants et résistants aux ITK[210]. Enfin, la démonstration de l'implication des microARN miR-30a et miR-144/451dans le mécanisme de résistances à l'imatinib sur des lignées modèles de LMC constituent de rares exemples d'étude fonctionnelle de microARN dans la LMC à cette époque[203,223,224].

Les années 2010 marquent un tournant dans l'intérêt porté aux microARN dans la LMC puisque le nombre d'entrées Pubmed référencées passe de 8 seulement entre

1993 et 2009 à 31 entre les années 2010 et 2012. A ce jour, il est intéressant de constater que seulement 122 publications concernent l'étude des microARN dans la LMC, soit trois fois moins que les référencements relatifs aux LAM, justifiant encore actuellement l'intérêt des études dans ce modèle.

L'objectif de nos travaux a été d'étudier l'effet de l'activité de BCR-ABL1 à la fois sur le profil d'expression des microARN et sur le protéome, afin de rechercher d'éventuelles régulations qui n'auraient pas été décrites. Nous avons pour cela traité des cellules K562, lignée modèle de LMC, par de l'imatinib et avons procédé à une analyse *microarray* afin d'identifier les microARN régulés par le blocage de l'oncoprotéine. En parallèle, nous avons étudié l'effet de ce même blocage sur le protéome des cellules des K562 à l'aide d'une approche d'analyse protéomique quantitative développée à la Plateforme de Génomique Fonctionnelle de Bordeaux: la technologie iTRAQ.

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'un article soumis cet été 2016 dans le journal *Oncotarget*. L'article a été évalué par deux *reviewers*, et l'éditeur nous suggère de soumettre une version révisée prenant en compte les remarques, ce qui sera fait fin décembre 2016. La version proposée initialement à l'éditeur est jointe ci-après.

II. Article

A Tyrosine kinase-STAT5-miR21-PDCD4 regulatory axis in chronic and acute myeloid leukemia cells

Anne-Sophie Espadinha[1,2], Valérie Prouzet-Mauléon[1,2], Stéphane Claverol[3], Valérie Lagarde[1,2], Marc Bonneu[3, 4,], François-Xavier Mahon[1,2] and Bruno Cardinaud[1,2,4 *]

[1] University of Bordeaux, INSERM U1035, Bordeaux, FRANCE.

[2] University of Bordeaux, INSERM U1218, Bordeaux, FRANCE.

[3] University of Bordeaux, Plateforme Protéome, CGFB, Bordeaux, FRANCE.

[4] Bordeaux Institut National Polytechnique, Bordeaux, FRANCE

* Corresponding author

E-mail: bruno.cardinaud@u-bordeaux.fr (BC)

6 figures

6 supplementary figures

1 supplementary table

KEYWORDS: CML, STAT5, miR-21, microRNA, leukemia

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are regulators of several key patho-physiological processes, including cell cycle and apoptosis. Using microarray-based miRNA profiling in K562 cells, a model of chronic myeloid leukemia (CML), we found that the oncoprotein BCR-ABL1 regulates the expression of miR-21, an "onco-microRNA", found to be overexpressed in several cancers. This effect relies on the presence of two STAT3/STAT5 binding sites on the promoter of miR-21, and on the phosphorylation

status of STAT5, a transcription factor activated by the kinase activity of BCR-ABL1. Mir-21 regulates the expression of PDCD4 (programmed cell death protein 4), a tumor suppressor identified through a proteomics approach. The phosphoSTAT5 — miR-21 — PDCD4 pathway was active in CML primary $CD34^+$ cells, but also in acute myeloid leukemia (AML) models like MV4.11 and MOLM13, where the constitutively active tyrosine kinase FLT3-ITD plays a similar role to BCR-ABL1 in CML cell lines.

Introduction

In chronic myeloid leukemia (CML), the activity of the constitutively active tyrosine kinase BCR-ABL1 [the product of the t(9;22)(q34;q11) chromosome translocation arising in hematopoietic stem cells of the bone marrow] drives the activation of the PI3K/AKT, JAK/STAT, and RAS/RAF/MEK/ERK pathways. Among other consequences, activated or inhibited transcription factors induce important modifications of the CML cells gene expression pattern that could impact cell cycle control, apoptosis and genetic instability, leading to the expansion of the oncogene-transformed cells and to the acquisition of potentially harmful *de novo* mutations [178]. However, indirect BCR-ABL1-dependant regulations might also occur, for instance through the action of microRNAs (miRNAs). Among the ~2000 miRNAs reported in humans, numerous species are up- or down-regulated in various cancer models. In the context of CML however, there is no clear consensus regarding the role of specific miRNAs, despite several studies [225,226].

Here, we studied the effects of a clinically relevant concentration of imatinib, a tyrosine-kinase inhibitor (TKI) that blocks BCR-ABL1, on the CML cell line K562: both the microRNA expression profile and the cells proteome were analyzed. Using microarray hybridization, RT-qPCR experiments and a functional assay, we identified miR-21 as one of the most significantly down-regulated microRNA in cells that were treated with imatinib. In parallel, a semi-quantitative proteomic approach identified the tumor suppressor *programmed cell death protein 4* (PDCD4) as the most over-expressed protein in imatinib-treated cells. We showed that miR-21 can bind to PDCD4 3'UTR and decrease its expression. The STAT5 - miR-21 - PDCD4 pathway was conserved in CML primary $CD34^+$ cells, and to some extent in acute myeloid leukemia (AML) models as well; the known functions of miR-21 and PDCD4 suggest

that their regulation by BCR-ABL1 could participate in the antileukemic response triggered by tyrosine kinase inhibitors.

Results

Imatinib treatment induces the significant regulation of 13 microRNAs in K562 cells

K562 cells were treated for 24h with 1 µM imatinib, a condition that induced apoptosis in less that 5% of the cells, as revealed by annexin V labeling (not shown). The treatment induced significant changes in the microRNA expression profile (Fig 1): a hierarchical clustering clearly ranked the samples according to the treatment (Fig 1A), revealing an overall modification of the miRNA expression profile. The 13 miRNAs that were significantly ($p<0.001$) dysregulated are listed on Fig 1B, altogether with a heatmap illustrating that the imatinib-induced effects concerned both up- and down-regulations. A subset of the microRNAs that are down- or up-regulated and their associated p-values (on the y-axis) are depicted on the volcano plot shown on Fig 1C. Five out of the seven up-regulated microRNAs revealed the previously described TKI-induced erythroid differentiation of K562 cells [227]: miR-144 and miR-451 are produced from the same pri-miRNA and are mostly expressed in the erythroid lineage where they participate in the late stages of erythropoiesis regulation [228]; miR-486 expression is also increased during erythroid differentiation [226]; miR-185 and miR-16 expression correlate with the appearance of erythroid surface antigens (CD71, CD36, and CD235a) and hemoglobin synthesis in cord blood-derived $CD34^{+}$ cells [229]. The down-regulated miRNAs were miR-21 and -21*, miR-625, miR-7, miR-106a, miR-126 and miR-130b. The regulation of miR-126 might also be a signature of the TKI-induced erythroid differentiation since this microRNA inhibits the erythropoiesis in $CD34^{+}$ cells [230]. Besides miR-625, that was expressed at very ^{low} levels in the K562 cells and has probably no regulatory functions, the other down-regulated microRNAs were not previously associated with erythroid differentiation, but rather with distinct steps or models of tumorigenesis. MiR-21 was specifically interesting for several reasons. First, it is known to be overexpressed in many solid tumors and is considered as a *bona fide* "oncomicroRNA" [231]. Second, in our experiments, it is highly expressed in non-treated K562 cells, thus suggesting regulatory functions, as only the most abundant miRNAs mediate efficient target suppression [232]. Third, the two mature forms miR-21 (miR-21-5p) and miR-21* (miR-21-3p) produced from the same precursor are down-regulated by imatinib treatment (Fig 1C); this reinforce the potential role of the *miR-21* locus in the biology of CML since both miR-21 and miR-

21* have specific targets and tumorigenic effects [32]. Finally, miR-21 has been rarely studied in the context of myeloid leukemias, strengthening the interest of studying this microRNA in our model.

The effect of BCR-ABL1 inhibition on the expression of miR-21 was studied by RT-qPCR. The results confirmed a significant down-regulation of miR-21 expression fol[low]ing a 24h imatinib treatment (relative expression ×0.47 ± 0.07, n=9). The effect also concerned the primary transcript of *miR-21*, pri-miR-21, that was quantified by RT-qPCR on RNA extracted from the nuclear fraction of treated- or non-treated cells (relative expression ×0.22 ± 0.05, n=10). This suggested that the imatinib-induced miR-21 decrease relied on a transcriptional regulation of the *miR-21* gene by BCR-ABL1 activity, although this miRNA can be regulated by post-transcriptional mechanisms in other models[233]. The imatinib treatment also produced an increase (×1.86 ± 0.13, n=2) of the luciferase activity of K562 cells transfected with a ―sensor‖ plasmid driving the transcription of a *Renilla* luciferase coding sequence fol[low]ed by a short 3'UTR containing two miR-21 complementary sequences; this functional assay also suggested an imatinib-induced decrease of miR-21. The specificity of the effect of imatinib was checked using BCR-ABL1-negative cell lines: on TF1 and HL60 (two acute myeloid leukemia cell lines) and on NTERA-2 (a pluripotent human embryonic carcinoma cell line, imatinib at 1 µM did not induce any miR-21 regulation (Supplementary Fig 1). On K562 cells, the second-generation TKI dasatinib (at 10nM) and nilotinib (at 20nM) induced a similar effect than imatinib on miR-21 expression (Supplementary Fig 2). Finally, we measured miR-21 in RNA prepared from induced pluripotent cells (iPSC) prepared from $CD34^+$ primary cells, and transduced or not with a lentivirus al[low]ing the expression of BCR-ABL1 (provided by Dr. A. Bedel, INSERM U1035, Bordeaux, France). The $BCR\text{-}ABL1^+$ cells expressed higher levels (x2) of miR-21 than the $BCR\text{-}ABL1^-$ cells (Supplementary Fig 3). Taken together, these results suggest that BCR-ABL1 activity positively regulates the expression of the oncomicroRNA miR-21.

STAT5 regulates the expression of miR-21 in K562 cells and is necessary for the imatinib-induced miR-21 regulation

In order to study the mechanism underlying the imatinib-induced regulation, we cloned a 517 bp genomic DNA fragment corresponding to the proximal *miR-21* promoter[234] into the luciferase vector pGL4.10. Luciferase activity expressed by K562 cells transfected with this construct, altogether with pri-miR-21 and miR-21

measurements by RT-qPCR revealed an imatinib-induced decrease of *miR-21* promoter activity, and suggested that the 517 bp DNA fragment contains regulatory element(s) necessary for the action of imatinib on the expression of miR-21 (Supplementary Fig 4). Among the transcription factors binding sites identified in this 517 bp fragment through a bioinformatics analysis (Genomatix), we focused on three STAT3 or STAT5 binding sites (Fig 2A), since (i) these transcription factors are known to be regulated by BCR-ABL1 activity in K562, in other CML cell lines and in CML primary cells as well [184 235] and (ii) STAT3 and/or STAT5 regulate miR-21 expression in mammary epithelial cells and in T cells [236–238]. The STAT3, STAT5 and STAT5B sites of the *miR-21* promoter were deleted and/or mutated (Supplementary Fig 5) and the corresponding pGL4.10 plasmids were transfected in K562 cells. Luciferase measurements revealed that deletions of both STAT3 and STAT5 sites significantly decreased the *miR-21* promoter activity (Fig 2B). Conversely, the STAT5B deletion has no effect on luciferase activity. Two-nucleotides substitutions in the STAT3, the STAT5 or in both the STAT3/STAT5 sites also sharply decreased the promoter activity. The presence and the integrity of these two sites were also necessary for the action of imatinib on the transcription of *miR-21*: deletions or mutations of the STAT3 and/or STAT5 sites abolished the imatinib-induced decrease of luciferase activity observed in cells transfected with either the wild-type or the STAT5B-deleted *miR-21* promoter (Fig 2B).

Of note, the two STAT sites of interest could be both identified either as STAT3 [239] or as STAT5 binding sites when using the TRANSFAC database. STAT3 and STAT5 recognize the same GAS motif (TTCnnnGAA), and the distinction of specific binding sites is not always justified: for instance, STAT3 and STAT5 are able to bind common sites across the locus encoding IL-17 [240]. We hypothesized a role of STAT5 rather than STAT3 in the transcription of *miR-21* for several reasons: the phosphorylation of STAT5 in CML cells, through the kinase activity of BCR-ABL1 [241], is correlated with the cells growth and viability [242]. Recent works revealed that STAT5 overexpression leads to a TKI-resistant phenotype, an effect that is independent of JAK2 expression, and that targeting STAT5 by drugs, like the neuroleptic drug pimozide [243] might be a promising perspective in the pharmacology of leukemia and other cancers as well. Moreover, STAT5 is expressed at much higher levels than STAT3 in K562 cells (transcriptomic analysis, not shown). In order to assess the potential role of STAT5 in the regulation of miR-21 and in the imatinib effect, K562 cells were transduced with a

lentivirus encoding a small hairpin RNA (shRNA) directed against the two isoforms STAT5A/B [244]. This induced a clear down-regulation of STAT5 expression (Fig 3A). The STAT5-shRNA K562 cells significantly expressed less mature miR-21 sequence than the control-shRNA cells, as revealed by both RT-qPCR (Fig 3B) and luciferase activity of control- or STAT5-shRNA K562 cells transfected with the ―sensor‖ plasmid (Fig 3C). Finally, in the STAT5-shRNA cells, BCR-ABL1 blocking by imatinib did not induce the transcriptional down-regulation of miR-21, as revealed by *miR-21* promoter studies (Fig 3D), but instead produced a slight up-regulation that might reflect the actions of others signaling pathways activated by BCR-ABL1. Taken together, these results suggest that STAT5 mediates the effects of BCR-ABL1 on the regulation of miR-21 in the CML cell line K562.

PDCD4 expression is regulated by BCR-ABL1 and miR-21

In order to gain insight into miRNA-dependent protein regulations, the proteome of control- or imatinib-treated K562 cells was analyzed by iTRAQ (*Isobaric tags for relative and absolute quantitation*), a semi-quantitative proteomic technique. The results al[low]ed the identification (by 2 distinct peptides or more) and the relative quantification of 1137 different proteins (Supplementary Table 1). Surprisingly, the imatinib treatment (1μM for 24 hours, n=2 independent samples of treated and non-treated cells) induced the over- or under-expression of only a limited number of proteins (Fig 4A). The under-expressed proteins (mean fold-change < 0.66) were the protein kinase LYN, the tubulin beta-2A (TUBB2A) and the neutral amino acid transporter SLC1A5/AAAT. The seven over-expressed proteins (mean fold-change > 1.5) were PDCD4, HBZ, RBM12B, AFG3L2, H2AFX, PKLR and ALDH1A1. Hemoglobin zeta (HBZ) overexpression reflects the erythroid differentiation induced by BCR-ABL1 inhibition in K562 cells and was the only protein found in common in our study and in the proteomic analysis of K562 cells based on the SILAC technique (Stable isotope labeling by amino acids in cell culture) published earlier [245]. The strongest (x2.8) imatinib-induced protein up-regulation concerned PDCD4 (programmed cell death protein 4), identified in our experiments by three unique peptides. PDCD4 is a tumor suppressor protein that acts as an inhibitor of cap-dependent translation by blocking the translation initiation factor eIF4A. PDCD4 inhibits transformation, translation, invasion and intravasation, and its expression is down-regulated in several cancers [246]. Its up-regulation induced by imatinib was confirmed by western blot (Fig 4A, inset) and concerned the *PDCD4* mRNA as well,

as revealed by RT-qPCR (×3.9 ± 0.8, n=7). Since it has been shown in several models that PDCD4 is a well characterized target of miR-21 [247], we hypothesized that imatinib-induced PDCD4 over-expression might rely on the down-regulation of miR-21 we observed earlier.

We artificially up- or down regulated miR-21 concentration by transfecting K562 cells respectively with a synthetic miRNA (miRNA mimic, Ambion) and an anti-miR-21 oligonucleotide (LNA, Exiqon), or with a control LNA. The efficacies of these treatments were checked using cells co-transfected with the miR-21 "sensor" plasmid (not shown). Anti-miR-21 LNA transfected K562 cells expressed a higher level of PDCD4 protein than the control LNA- or miR-21 mimic-transfected cells (Fig 4B). The expression of miR-21 was also artificially abolished by CRISPR/Cas9 gene inactivation[248] : K562 were transfected with a plasmid al[low]ing the expression of a previously validated single guide RNA [32], of Cas9 and of the *pac* gene encoding a puromycin N-acetyl-transferase. After puromycin selection, resistant cells were cloned using methylcellulose, then grown in liquid medium and further analyzed for the presence of mutations in the *miR-21* gene: two out of the seven tested K562 clones had deletions in each of the 3 *miR-21* copies (K562 cells are triploid), as revealed by sequencing (Supplementary Fig 6). The 9 to 36bp deletions, all located in the immediate proximity of the sequence of miR-21, were associated with an absence of miR-21 expression, as shown by RT-qPCR (miR-21 relative expression as compared to WT cells: x0.0001 for clone 5A, x0.002 for clone 7B). In these miR-21 KO cells, PDCD4 expression was upregulated as revealed by western blot (Fig 4C), confirming the results of the miR-21 knock-down experiments described earlier.

It is likely that the effects of the anti-miR-21 LNA and of miR-21 knock-out on PDCD4 protein levels relied on a post-transcriptional regulation of *PDCD4* by miR-21: this is suggested by luciferase activity measurements in K562 cells transfected with a reporter plasmid containing a 554 bp fragment of the *PDCD4* 3‘UTR placed downstream of a *Renilla* luciferase coding sequence; co-transfection of these cells with the anti-miR-21 LNA induced an increase of the luciferase activity, revealing a regulatory effect of miR-21 on the 3‘UTR of *PDCD4* (Figure 4D). The specificity of this effect was verified using a reporter plasmid harboring a deletion of the miR-21 binding site that was previously discovered in the *PDCD4* 3‘UTR [247]. Altogether, these results suggest that miR-21 could be an intermediary of the imatinib-induced PDCD4 up-regulation.

Phospho-STAT5, miR-21 and PDCD4 regulation by Imatinib in CD34 primary cells from CML patients and AML cell lines

In CML, the largest part of the $CD34^+$ fraction expresses BCR-ABL1 and is sensitive to imatinib or others TKI. As observed on the K562 cell line, imatinib treatment decreased the expression of miR-21 and increased the expression of *PDCD4* mRNA in $CD34^+$ cells prepared from four CML patients (Fig 5A), although these effects were observed at 5μM imatinib (and not at 1μM). It is likely that the effect on miR-21 expression relied on a decreased activity of the *miR-21* promoter, as shown using CML $CD34^+$ cells transduced with a *miR-21* promoter-luciferase lentivirus and treated for 0-24h with either vehicle or 5μM imatinib (Fig 5B). Western blot analysis showed that STAT5 was dephosphorylated in the presence of imatinib (Fig 5C), confirming earlier studies [241] and suggesting, as this is the case in the K562 cell line, that phospho-STAT5 activates the transcription of *miR-21* in CML $CD34^+$ cells.

STAT5 is activated in acute myeloid leukemia (AML), in particular in the subtypes harboring the internal tandem duplication (ITD) mutations of the tyrosine kinase FLT3 [249]. In parallel, several studies revealed an upregulation of miR-21 across subtypes of AML [250]. It was then tempting to assess the possibility that the STAT5-miR-21 pathway concerns AML models as well. MV4.11 and MOLM13 cells, two FLT3-ITD^+ cell lines, were treated for 24 hours with 0.1 μM sunitinib, a TKI that blocks FLT3-ITD. This treatment decreased miR-21, *miR-21* promoter activity and increased *PDCD4* mRNA levels (Fig 6A). The TKI also produced a dephosphorylation of STAT5 in the two cell types (Fig 6B). MOLM13 were transfected with the pGL4.10 reporter plasmids: as this is the case in K562, the 2-nt mutations introduced in the STAT3/5 binding sites strongly reduced the luciferase activity of the transfected cells (Fig 6C). Taken together, these results suggested that the phosphorylation of STAT5, driven directly or indirectly by BCR-ABL1 (in CML) and FLT3-ITD (in AML), could transcriptionally up-regulate the expression of miR-21 and, in turn, contribute to the subsequent regulation of PDCD4, among other miR-21 targets.

Discussion

MiR-21 is overexpressed in almost all types of human cancers, including leukemia, and has been associated with the regulation of proliferation, growth, invasion and chemoresistance. Its anti-apoptotic properties were previously confirmed in K562 cells [251,252]. Mir-21 is over-expressed (among other microRNAs) in primary $CD34^+$ cells of

TKI-resistant patients [108] and in the blastic phase of the disease [253]; it might participate in the TKI-dependent apoptosis of the $CD34^+$ CML cells [204]. Using various models, several upstream regulators were shown to participate to the regulation of miR-21 expression, like for instance the histone demethylase RBP2, the androgen receptor, NF-κB, Foxo3a or AP-1 [231 253]. The activity of factors of the STAT family have also been described: STAT3 binds to regulatory regions of *miR-21* in Sézary T cells that harbor a constitutive STAT3 activation and also in a model of IL-21-induced B lymphocyte maturation [236]. The role of STAT5 in the expression of miR-21 was also studied in the developing mammary alveolar epithelium [237], and more recently in a cutaneous T cell lymphoma [238]. Our results extend the regulation of miR-21 by STAT5 to CML, where the role of this transcription factor seems essential, since 2-nt mutations in the STAT3/5 binding sites significantly and strongly reduce the activity of the *miR-21* promoter.

In CML $CD34^+$, TKI induce a rapid and complete dephosphorylation of STAT5. The effect on STAT3 is much less pronounced, a difference that could rely on the ability of BCR-ABL1 to directly phosphorylate STAT5 [241]. This reinforces the central role of STAT5 in the maintenance of chronic myeloid leukemia [254 241], in accordance with the known effects of this transcription factor on cell cycle, apoptosis, production of ROS and the sensitivity of $CD34^+$ cells to TKI [254]. Interestingly, these processes are regulated by miR-21 as well [204,231]. Taking into account the fact that STAT5 activates miR-21 expression, it is tempting to propose that miR-21 could participate in some of the STAT5-dependant regulations in CML.

Material and methods.

Cell lines

The CML cells line K562 and the AML cell lines (MOLM13 and MV4.11) were obtained from the DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures). They were grown at 37°C / 5% CO2 in RPMI medium (Invitrogen) supplemented with 10% foetal calf serum and penicillin/streptomycin, and split every 2-3 days.

Patient samples and $CD34^+$ cell isolation

Cytapheresis samples from four CML patients were obtained at diagnosis according to the *Etablissement Français du Sang* recommendations. Mononuclear cells were obtained by Ficoll density gradient centrifugation. They were labeled with the StemSep™ Human CD34 Positive Selection Cocktail (Stemcell Technologies) and

isolated on MS column (Miltenyi Biotec). $CD34^+$ cells were kept for 2-3 days in StemAlpha A medium (StemAlpha) in the presence of Flt3-ligand (50ng/ml), thrombopoietin (50ng/ml) and stem cell factor (50ng/ml). Cytokines were not included during the course of imatinib treatments.

RNA preparation, miRNA microarray hybridization and RT-qPCR

When prepared for microarray hybridization, RNAs were extracted from Trizol homogenates using a modified protocol: after chloroform extraction and phases separation, 1.5 volumes of 100% ethanol were added to the upper aqueous phase. The mix was deposited onto a RNeasy column (Qiagen), that was further processed according to manufacturer instructions. Cyanine-3 (Cy3) labeled miRNAs were prepared from 0.2 µg RNA using the miRNA complete labeling kit version 2.2 (Agilent Technologies). Labeled miRNAs were hybridized overnight at 55°C onto Human miRNA Microarray V2 (Agilent Technologies) slides. The slides were then washed as recommended by the manufacturer, and scanned on an Agilent G2565CA scanner, at 5 µm resolution and using the 20-bit scan mode. Images were processed with Feature Extraction (version 10.7). Data were quantile-normalized for inter-array comparisons and analyzed using the ―BRB-Array Tools‖ package, version 4.2.0 [255]. Genes that were differentially expressed among the groups were identified using a F-test (Class Comparison Between groups of arrays Package, BRB-Array Tools). Normalized data for all samples have been deposited in NCBI Gene Expression Omnibus and are accessible through GEO Series accession number GSE78037.

For RT-qPCR experiments, RNAs were prepared from Trizol homogenates by precipitation from the aqueous phase fol[low]ing the supplier's recommendations. For RT-qPCR of miR-21, RNA (200ng) were polyadenylated and reverse-transcribed using the High Specificity miRNA First Strand cDNA synthesis kit (Agilent). After reverse transcription, the PCR reaction was analyzed by real time quantitative PCR (RT-qPCR) using a universal reverse primer (GACGAGCTGCCTCAGTC) and either a miR-21 (TAGCTTATCAGACTGATGTTGA) or a U6 (ATTGGAACGATACAGAGAAGATTAG) forward primer. The cycle thresholds (CT) obtained for miR-21 were normalized using U6 as endogenous gene. For RT-qPCR of PDCD4 and pri-miR-21, the Transcriptor First Strand cDNA synthesis kit (Roche) was used for reverse transcription. The sequences of the primers were TTTTGTTTTGCTTGGGAGGA and AGCAGACAGTCAGGCAGGAT (for pri-miR-21); GAAGGTTGCTGGATAGGCGA and TTGGTAGTCCCCTTCCTTTCC (for

PDCD4); TGGAGGGTGTCCGCAATGTT and GAAGGCCTTGACCTTTTCAG (for HUPO, used here to normalize the CT obtained for pri-miR-21 and PDCD4). Both types of qPCR (miR-21 and PDCD4/pri-miR-21) were performed with the GoTaq qPCR Master Mix (Promega), using a Biorad CFX96 Real-Time PCR system.

Plasmids preparation and lentivirus production

The PCR steps were done using Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs). For the miR-21 sensor plasmid construction, two 42-mer oligonucleotides (CCGCTCGAGTCAACATCAGTCTGATAAGCTACTATCATCAACATCAGTCT GATAAGCTAGCGGCCGCATTCTTAT and ATAAGAATGCGGCCGCTAGCTTATCAGACTGATGTTGATGATAGTAGCTTA TCAGACTGATGTTGACTCGAGCGG) were annealed to form a double-stranded adapter containing two miR-21-binding sequences, that was cloned at the XhoI/NotI of the psiCheck2^{TM} (Promega) downstream of the Renilla luciferase cds. The miR-21 promoter (517bp fragment corresponding to the miR-21 studied by Fujita et al.[234]) was PCR amplified from human genomic DNA (Promega) using the primers CGGTTTAACAGCACTGCCTCCA and GTCCTCAGAGTAAGGTCAGCTC, and inserted by ligation in the pGL4.10 plasmid (Promega) downstream of the Firefly luciferase cds. The deletions and mutations of the transcription factors binding sites were introduced by PCR amplification / DpnI digestion of the WT miR-21 promoter pGL4.10 plasmid and sequence-verified. The positions of the deletions and of the mutations are depicted in Supplementary Fig 5. The WT miR-21 promoter was also inserted upstream of the Firefly luciferase cds in a lentiviral vector (lentiviral vector #165 of the Vect'UBfacility, Bordeaux, France). The PDCD4 3'UTR (554 bp fragment corresponding to the positions 1765-2319 of NM_145341) was PCR amplified from human genomic DNA and cloned in the psiCheck2^{TM} plasmid (Promega). The sequence corresponding to the miR-21 seed-binding site (ATAAGCTA) was deleted from the PDCD4 3'UTR as described earlier. The STAT5- and control-shRNA lentiviral vectors were a gift of Dr. I. Dusanter-Fourt, Institut Cochin, Paris, France).

Transfection and transduction of cell lines

For reporter analysis (miR-21 sensor plasmid, WT and mutated miR-21 promoter plasmids, WT and mutated PDCD4 3'UTR plasmid), cells were split the day before transfection at 200.000 cells/ml, then seeded in 96-well white plates (Dutscher). They were transfected with 400ng of plasmid using the Viafect reagent (Promega). For miR-21 promoter studies (pGL4.10 transfections), 20ng of the CMV-Renilla luciferase

pGL4.75 plasmid (Promega) was added in order assess and take into account the transfection efficiency. The Firefly and Renilla luciferase activities luminescence were measured 24h post-transfection using the DualGlo-Luciferase Reporter Assay System (Promega). For STAT5 knock-down experiments (STAT5- or control-shRNA lentiviruses), cells were transduced at a multiplicity of infection (MOI) of 5, then sorted 48 hours later according to the expression of GFP. For miR-21 promoter activity measurements in $CD34^+$ cells and AML cell lines, cells were transduced at a MOI of 5 with the miR-21 promoter lentivirus and used thereafter without selection or sorting.

CRISPR/Cas9 inactivation of miR-21

Two oligonucleotides (CACCGGTCTGATAAGCTACCCGACA and AAACTGTCGGGTAGCTTATCAGACC) were annealed to form a double-stranded adapter that was cloned at the BbsI of the pSpCas9n(BB)-2A-Puro plasmid (a gift from Feng Zhang, Addgene # 48141). The D10 nickase Cas9 cloned into this plasmid was replaced by the wild-type (*i.e.* nuclease) version. K562 cells were transfected with the plasmid by Amaxa nucleofection, and 24 hours later puromycin (2µg/ml) was added to the culture medium. After 48 hours of selection, live cells were diluted in methylcellulose-containing medium (1000 cells per ml). After 10 days, colonies were picked up and transferred into individual wells containing liquid medium. Mutations in the miR-21 gene were detected by cloning (into the pCR2.1-TOPO® plasmid (Invitrogen)) of PCR products obtained using primers CTAGCATGTACTCTGGTTTCAACAGA and CACAAAAGACTCTAAGTGCCACCA on cells lysates. Twelve distinct plasmids obtained from each cell clone were sequenced. The quantification of miR-21 expression was performed by RT-qPCR as described earlier.

Immunoblotting

Cells were pre-treated with 10µM Na_3VO_4 for 30 min before collection. After two washes in PBS-Na_3VO_4, pellets were suspended in RIPA lysis buffer. Supernatant were collected and proteins were quantified with the Pierce BCA kit (Biorad). Samples (50µg) were denatured by incubating 5 min at 95°C in reducing sample buffer, loaded on 10% SDS-PAGE gels. After migration, proteins were transferred onto a PVDF membrane. The antibodies (PDCD4: Abcam ref. 51495; phospho-STAT5: Cell Signaling ref. 9351 ; STAT5: SantaCruz ref. SC-835; Actin: Sigma ref. A2066) were used at a 1/1000 dilution in TBST/5% nonfat dry milk. The horseradish

peroxidase-conjugated secondary antibodies (Vector Laboratories ref. PI-1000 for anti-PDCD4, phospho-STAT5, Actin antibodies; Vector Laboratories ref. PI-9500 for anti-STAT5 antibody) were used at the dilution of 1/10000 and detected using Western Lighting Plus-ECL (Perkin Elmer).

Semi-quantitative proteomics

K562 cells (5.10^6) were seeded at the concentration of 500.000 cells/ml and either treated with 1µM imatinib for 24h or left untreated. After centrifugation, they were washed twice with PBS and the pellets were dissolved in 100 ul of urea (8M), thiourea (2M), Chaps (2%), Hepes (50mM), pH7.5. The undissolved materials were removed by centrifugation. Proteins were precipitated in TCA 15% (v/v), washed twice with acetone and suspended in urea (7M), thiourea (2M), Chaps (4%). Supernatant protein concentration was assessed by Bradford. A hundred µg was digested with trypsin and labeled with iTRAQ 8-plex (AB SCIEX) according to the manufacturer‘s instructions.

Briefly, samples were reduced with TCEP and alkylated with MMTS before being digested overnight with trypsin. The labeled samples were pooled and subsequently purified on SCX chromatography, desalted on a C18 cartridge and eluted peptides were submitted to the 3100 OFFGEL Fractionator (Agilent Technologies) with the OFFGEL High Res Kit pH 3-10 (Agilent Technologies) immobilized pH gradient (IPG) DryStrips. The peptides were separated according to the manufacturer's instructions. After separation, the 24 fractions were acidified with acetic acid 0.1% (v/v) and subsequently analyzed by LC-MS/MS with a nano LC system coupled ton an LTQ Orbitrap XL (ThermoFinnigan) as previously described[256]. Ten microliters of peptide digests were desalted onto a 300-µm i.d. × 5-mm C18 PepMap™ trap column (Dionex) at a f^{low} rate of 30 µL/min and separated onto an analytical 75-µm i.d. × 15-cm C18 PepMap column (Dionex). Mobile phases were a mix of solvent A (0.1% formic acid in 5% ACN) and solvent B (0.1% formic acid in 80% ACN). Elution was performed using a 5–40% linear gradient of solvent B for 105 min. The separation f^{low} rate was set at 200 nL/min. Data were acquired in a data-dependent mode that alternated an MS scan survey over an m/z range of 300–2000, and three MS/MS scans of top 3 ions both in CID and PQD fragmentation mode. Monocharged ions were rejected and the dynamic exclusion duration was set to 20 sec.

Data were searched by SEQUEST through Proteome Discoverer 1.3 (Thermo Fisher Scientific Inc.) against Homo sapiens Complete Proteome Set (Uniprot version 2011-01: 58009 entries). Spectra from peptides higher than 5000 Da or ^{low}er than 350 Da

were rejected. The search parameters were as follows: mass accuracy of the monoisotopic peptide precursor and peptide fragments was set to 10 ppm and 0.5 Da respectively. Only b- and y-ions were considered for mass calculation. Oxidation of methionines (+16 Da) was considered as variable modification and cysteine alkylation with MMTS (+46 Da) as fixed modification. iTRAQ 8-plex labeling of lysine and peptide N-terminal were also considered as fixed modification. Two missed trypsin cleavages were allowed. Peptide validation was performed using Percolator algorithm [257] and only "high confidence" peptides were retained corresponding to a 1% False Positive Rate at peptide level. Quantitation was performed with Proteome Discoverer: protein ratios were the average of considered peptide ratio.

Statistics

RT-qPCR datas and luciferase measurements were analyzed by the GraphPad software. When shown on graphs, error bars represent S.E. of the number of determination. Two-tailed Student t tests were used for statistical analysis.

Acknowledgement:

The authors thank the staff of Vect'UB, the vectorology platforms (INSERM US 005 – CNRS UMS 3427- TBM-Core, Université de Bordeaux, France) for the lentivirus productions, Dr A. Bedel (INSERM U1035) for the gift of BCR-ABL1-positive and -negative iPS cells cDNA and Dr I. Dusanter-Fourt (Institut Cochin, Paris) for the STAT5- and control-shRNA lentiviral vectors.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest The authors declare no conflict of interest Grant Support:

This work was supported by grants from the SIRIC BRIO (*Bordeaux Recherche Intégrée en Oncologie*), the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* (INSERM), the University of Bordeaux, the Federative Research Structure "Biology: from basics to Medicine" ("TransBioMed") and the *Ligue Nationale contre le Cancer (comités Landes and Charentes).*

References

Ameres, S.L., and Zamore, P.D. (2013). Diversifying microRNA sequence and function. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *14*, 475–488.

Aqeilan, R.I., Calin, G.A., and Croce, C.M. (2009). miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. Cell Death Differ. *17*, 215–220.

Ason, B., Darnell, D.K., Wittbrodt, B., Berezikov, E., Kloosterman, W.P., Wittbrodt, J., Antin, P.B., and Plasterk, R.H.A. (2006). Differences in vertebrate microRNA expression. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 14385–14389.

Báez-Vega, P.M., Echevarría Vargas, I.M., Valiyeva, F., Encarnación-Rosado, J., Roman, A., Flores, J., Marcos-Martínez, M.J., and Vivas-Mejía, P.E. (2016). Targeting miR-21-3p inhibits proliferation and invasion of ovarian cancer cells. Oncotarget *7*, 36321–36337.

Barnes, N.A., Stephenson, S., Cocco, M., Tooze, R.M., and Doody, G.M. (2012). BLIMP-1 and STAT3 counterregulate microRNA-21 during plasma cell differentiation. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *189*, 253–260.

Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. Cell *136*, 215–233.

Behm-Ansmant, I., Massenet, S., Immel, F., Patton, J.R., Motorin, Y., and Branlant, C. (2006). A previously unidentified activity of yeast and mouse RNA:pseudouridine synthases 1 (Pus1p) on tRNAs. RNA N. Y. N *12*, 1583–1593.

Bernstein, E., Kim, S.Y., Carmell, M.A., Murchison, E.P., Alcorn, H., Li, M.Z., Mills, A.A., Elledge, S.J., Anderson, K.V., and Hannon, G.J. (2003). Dicer is essential for mouse development. Nat. Genet. *35*, 215–217.

Bhatia, M., Wang, J.C., Kapp, U., Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94*, 5320–5325.

Bissels, U., Bosio, A., and Wagner, W. (2012). MicroRNAs are shaping the hematopoietic landscape. Haematologica *97*, 160–167.

Borchert, G.M., Lanier, W., and Davidson, B.L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. Nat. Struct. Mol. Biol. *13*, 1097–1101.

Bourassa, M.W., and Ratan, R.R. (2014). The interplay between microRNAs and histone deacetylases in neurological diseases. Neurochem. Int. *77*, 33–39.

Boyerinas, B., Park, S.-M., Hau, A., Murmann, A.E., and Peter, M.E. (2010). The role of let-7 in cell differentiation and cancer. Endocr. Relat. Cancer *17*, F19–F36.

Braun, J.E., Huntzinger, E., Fauser, M., and Izaurralde, E. (2011). GW182 proteins directly recruit cytoplasmic deadenylase complexes to miRNA targets. Mol. Cell *44*, 120–133.

Burroughs, A.M., Ando, Y., de Hoon, M.J.L., Tomaru, Y., Suzuki, H., Hayashizaki, Y., and Daub, C.O. (2011). Deep-sequencing of human argonaute-associated small RNAs provides insight into miRNA sorting and reveals argonaute association with RNA fragments of diverse origin. RNA Biol. *8*, 158–177.

Cai, X. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. RNA *10*, 1957–1966.

Calin, G.A., and Croce, C.M. (2006a). Genomics of chronic lymphocytic leukemia microRNAs as new players with clinical significance. Semin. Oncol. *33*, 167–173.

Calin, G.A., and Croce, C.M. (2006b). MicroRNAs and chromosomal abnormalities in cancer cells. Oncogene *25*, 6202–6210.

Canella, D., Praz, V., Reina, J.H., Cousin, P., and Hernandez, N. (2010). Defining the RNA polymerase III transcriptome: Genome-wide localization of the RNA polymerase III transcription machinery in human cells. Genome Res. *20*, 710–721.

Casetti, L., Martin-Lannerée, S., Najjar, I., Plo, I., Augé, S., Roy, L., Chomel, J.-C., Lauret, E., Turhan, A.G., and Dusanter-Fourt, I. (2013). Differential contributions of STAT5A and STAT5B to stress protection and tyrosine kinase inhibitor resistance of chronic myeloid leukemia stem/progenitor cells. Cancer Res. *73*, 2052–2058.

Chakraborty, C., Sharma, A.R., Patra, B.C., Bhattacharya, M., Sharma, G., and Lee, S.-S. (2016). MicroRNAs mediated regulation of MAPK signaling pathways in chronic myeloid leukemia. Oncotarget.

Cheloufi, S., Dos Santos, C.O., Chong, M.M.W., and Hannon, G.J. (2010). A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. Nature *465*, 584–589.

Choong, M.L., Yang, H.H., and McNiece, I. (2007). MicroRNA expression profiling during human cord blood-derived CD34 cell erythropoiesis. Exp. Hematol. *35*, 551–564.

Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., et al. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 13944–13949.

Coppo, P., Flamant, S., De Mas, V., Jarrier, P., Guillier, M., Bonnet, M.-L., Lacout, C., Guilhot, F., Vainchenker, W., and Turhan, A.G. (2006). BCR-ABL activates STAT3 via JAK and MEK pathways in human cells. Br. J. Haematol. *134*, 171–179.

Costaglioli, P., Barthe, C., Claverol, S., Brözel, V.S., Perrot, M., Crouzet, M., Bonneu, M., Garbay, B., and Vilain, S. (2012). Evidence for the involvement of the anthranilate degradation pathway in Pseudomonas aeruginosa biofilm formation. MicrobiologyOpen *1*, 326–339.

Davis, B.N., Hilyard, A.C., Lagna, G., and Hata, A. (2008). SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. Nature *454*, 56–61.

Dexter, T.M., Wright, E.G., Krizsa, F., and Lajtha, L.G. (1977). Regulation of haemopoietic stem cell proliferation in long term bone marrow cultures. Biomed. Publiee Pour AAICIG *27*, 344–349.

Du, T., and Zamore, P.D. (2005). microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. Dev. Camb. Engl. *132*, 4645–4652.

Dueck, A., Ziegler, C., Eichner, A., Berezikov, E., and Meister, G. (2012). microRNAs associated with the different human Argonaute proteins. Nucleic Acids Res. *40*, 9850–9862.

Eaves, C.J. (2015). Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. Blood *125*, 2605–2613.

Engels, B.M., and Hutvagner, G. (2006). Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. Oncogene *25*, 6163–6169.

Eulalio, A., Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2008). GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. Nat. Struct. Mol. Biol. *15*, 346– 353.

Fabian, M.R., and Sonenberg, N. (2012). The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. Nat. Struct. Mol. Biol. *19*, 586–593.

Feuermann, Y., Kang, K., Shamay, A., Robinson, G.W., and Hennighausen, L. (2014). MiR-21 is under control of STAT5 but is dispensable for mammary development and lactation. PloS One *9*, e85123.

Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? Nat. Rev. Genet. *9*, 102–114.

Flamant, S., Ritchie, W., Guilhot, J., Holst, J., Bonnet, M.-L., Chomel, J.-C., Guilhot, F., Turhan, A.G., and Rasko, J.E.J. (2010). Micro-RNA response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia. Haematologica *95*, 1325–1333.

Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. Genome Res. *19*, 92–105.

Fujita, S., Ito, T., Mizutani, T., Minoguchi, S., Yamamichi, N., Sakurai, K., and Iba, H. (2008). miR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism. J. Mol. Biol. *378*, 492–504. .

Ge, Y., Zhang, L., Nikolova, M., Reva, B., and Fuchs, E. (2016). Strand-specific in vivo screen of cancer-associated miRNAs unveils a role for miR-21( ) in SCC progression. Nat. Cell Biol. *18*, 111–121.

Ghildiyal, M., and Zamore, P.D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. Nat. Rev. Genet. *10*, 94–108.

Guo, S., Lu, J., Schlanger, R., Zhang, H., Wang, J.Y., Fox, M.C., Purton, L.E., Fleming, H.H., Cobb, B., Merkenschlager, M., et al. (2010). MicroRNA miR-125a controls hematopoietic stem cell number. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 14229–14234.

Gwizdek, C., Ossareh-Nazari, B., Brownawell, A.M., Evers, S., Macara, I.G., and Dargemont, C. (2004). Minihelix-containing RNAs mediate exportin-5-dependent nuclear export of the double-stranded RNA-binding protein ILF3. J. Biol. Chem. *279*, 884–891.

Ha, M., and Kim, V.N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *15*, 509– 524.

Haas, G., Braun, J.E., Igreja, C., Tritschler, F., Nishihara, T., and Izaurralde, E. (2010). HPat provides a link between deadenylation and decapping in metazoa. J. Cell Biol. *189*, 289–302.

Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Nam, J.-W., Heo, I., Rhee, J.-K., Sohn, S.Y., Cho, Y., Zhang, B.-T., and Kim, V.N. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. Cell *125*, 887–901.

Hantschel, O., Warsch, W., Eckelhart, E., Kaupe, I., Grebien, F., Wagner, K.-U., Superti-Furga, G., and Sexl, V. (2012). BCR-ABL uncouples canonical JAK2-STAT5 signaling in chronic myeloid leukemia. Nat. Chem. Biol. *8*, 285–293.

Harrison, D.E., and Zhong, R.K. (1992). The same exhaustible multilineage precursor produces both myeloid and lymphoid cells as early as 3-4 weeks after marrow transplantation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *89*, 10134–10138.

Hartmann, C., Corre-Menguy, F., Boualem, A., Jovanovic, M., and Lelandais-Brière, C. (2004). [MicroRNAs: a new class of gene expression regulators]. Med. Sci. MS *20*, 894–898.

Hordyjewska, A., Popiołek, Ł., and Horecka, A. (2014). Characteristics of hematopoietic stem cells of umbilical cord blood. Cytotechnology *67*, 387–396.

Hu, H., Li, Y., Gu, J., Zhu, X., Dong, D., Yao, J., Lin, C., and Fei, J. (2010). Antisense oligonucleotide against miR-21 inhibits migration and induces apoptosis in leukemic K562 cells. Leuk. Lymphoma *51*, 694–701.

Huang, X., Gschweng, E., Van Handel, B., Cheng, D., Mikkola, H.K.A., and Witte, O.N. (2011). Regulated expression of microRNAs-126/126* inhibits erythropoiesis from human embryonic stem cells. Blood *117*, 2157–2165.

Iliopoulos, D., Malizos, K.N., Oikonomou, P., and Tsezou, A. (2008). Integrative MicroRNA and Proteomic Approaches Identify Novel Osteoarthritis Genes and Their Collaborative Metabolic and Inflammatory Networks. PLOS ONE *3*, e3740.

Irvine, D.A., and Copland, M. (2012). Targeting hedgehog in hematologic malignancy. Blood *119*, 2196–2204.

Jacquel, A., Herrant, M., Legros, L., Belhacene, N., Luciano, F., Pages, G., Hofman, P., and Auberger, P. (2003). Imatinib induces mitochondria-dependent apoptosis of the Bcr-Abl-positive K562 cell line and its differentiation toward the erythroid lineage. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *17*, 2160–2162.

Jongen-Lavrencic, M., Sun, S.M., Dijkstra, M.K., Valk, P.J.M., and Löwenberg, B. (2008). MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia. Blood *111*, 5078–5085.

Jørgensen, H.G., Allan, E.K., Jordanides, N.E., Mountford, J.C., and Holyoake, T.L. (2007). Nilotinib exerts equipotent antiproliferative effects to imatinib and does not induce apoptosis in CD34+ CML cells. Blood *109*, 4016–4019.

Jurkovicova, D., Lukackova, R., Magyerkova, M., Kulcsar, L., Krivjanska, M., Krivjansky, V., and Chovanec, M. (2015). microRNA expression profiling as supportive diagnostic and therapy prediction tool in chronic myeloid leukemia. Neoplasma *62*, 949–958.

Käll, L., Canterbury, J.D., Weston, J., Noble, W.S., and MacCoss, M.J. (2007). Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. Nat. Methods *4*, 923–925.

Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. Cell *115*, 209–216.

Kim, Y., and Kim, V.N. (2012). MicroRNA factory: RISC assembly from precursor microRNAs. Mol. Cell *46*, 384–386.

Kim, V.N., Han, J., and Siomi, M.C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *10*, 126–139.

Kumarswamy, R., Volkmann, I., and Thum, T. (2011). Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. RNA Biol. *8*, 706–713.

Labbaye, C., and Testa, U. (2012). The emerging role of MIR-146A in the control of hematopoiesis, immune function and cancer. J. Hematol. Oncol.J Hematol Oncol *5*, 13.

Ladewig, E., Okamura, K., Flynt, A.S., Westholm, J.O., and Lai, E.C. (2012). Discovery of hundreds of mirtrons in mouse and human small RNA data. Genome Res. *22*, 1634–1645.

Lagos-Quintana, M. (2001). Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. Science *294*, 853–858.

Lankat-Buttgereit, B., and Göke, R. (2009). The tumour suppressor Pdcd4: recent advances in the elucidation of function and regulation. Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ. *101*, 309–317.

Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., and Bartel, D.P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans. Science *294*, 858–862.

Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell *75*, 843–854.

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., et al. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. Nature *425*, 415–419.

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. EMBO J. *23*, 4051–4060.

Li, Y., Zhu, X., Gu, J., Dong, D., Yao, J., Lin, C., Huang, K., and Fei, J. (2010). Anti-miR-21 oligonucleotide sensitizes leukemic K562 cells to arsenic trioxide by inducing apoptosis. Cancer Sci. *101*, 948–954.

Lin, S.-L., Chang, D., Wu, D.-Y., and Ying, S.-Y. (2003). A novel RNA splicing-mediated gene silencing mechanism potential for genome evolution. Biochem. Biophys. Res. Commun. *310*, 754–760.

Lindahl, L.M., Fredholm, S., Joseph, C., Nielsen, B.S., Jønson, L., Willerslev-Olsen, A., Gluud, M., Blümel, E., Petersen, D.L., Sibbesen, N., et al. (2016). STAT5 induces miR-21 expression in cutaneous T cell lymphoma. Oncotarget.

Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J., and Parker, R. (2005). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. Nat. Cell Biol. *7*, 719–723.

Löffler, D., Brocke-Heidrich, K., Pfeifer, G., Stocsits, C., Hackermüller, J., Kretzschmar, A.K., Burger, R., Gramatzki, M., Blumert, C., Bauer, K., et al. (2007). Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. Blood *110*, 1330–1333.

Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., et al. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature *435*, 834–838.

Lu, Z., Liu, M., Stribinskis, V., Klinge, C.M., Ramos, K.S., Colburn, N.H., and Li, Y. (2008). MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. Oncogene *27*, 4373–4379.

Lund, E. (2004). Nuclear Export of MicroRNA Precursors. Science *303*, 95–98.

MacFarlane, L.-A., and Murphy, P.R. (2010). MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. Curr. Genomics *11*, 537–561.

Machová Poláková, K., Lopotová, T., Klamová, H**., Burda, P., Trněný, M., Stopka, T., and Moravcová,** J. (2011). Expression patterns of microRNAs associated with CML phases and their disease related targets. Mol. Cancer *10*, 41.

Mancini, S.J.C., Mantei, N., Dumortier, A., Suter, U., MacDonald, H.R., and Radtke, F. (2005). Jagged1-dependent Notch signaling is dispensable for hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. Blood *105*, 2340–2342.

Mathelier, A., and Carbone, A. (2013). Large scale chromosomal mapping of human microRNA structural clusters. Nucleic Acids Res. *41*, 4392–4408.

Mavrakis, K.J., and Wendel, H.-G. (2010). TargetScreen: an unbiased approach to identify functionally important microRNA targets. Cell Cycle Georget. Tex *9*, 2080–2084.

Mcculloch, E.A., and Till, J.E. (1960). The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. Radiat. Res. *13*, 115–125.

Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 Mediates RNA Cleavage Targeted by miRNAs and siRNAs. Mol. Cell *15*, 185–197.

Merhautova, J., Hezova, R., Poprach, A., Kovarikova, A., Radova, L., Svoboda, M., Vyzula, R., Demlova, R., and Slaby, O. (2015). miR-155 and miR-484 Are Associated with Time to Progression in Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated with Sunitinib. ResearchGate *2015*, 1–5.

Metcalf, D. (1970). Studies on colony formation in vitro by mouse bone marrow cells. II. Action of colony stimulating factor. J. Cell. Physiol. *76*, 89–99.

Metzler, M., Wilda, M., Busch, K., Viehmann, S., and Borkhardt, A. (2004). High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. Genes. Chromosomes Cancer *39*, 167–169.

Meyer, K.D., Saletore, Y., Zumbo, P., Elemento, O., Mason, C.E., and Jaffrey, S.R. (2012). **Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3‘ UTRs and near stop** codons. Cell *149*, 1635–1646.

Morrison, S.J., and Weissman, I.L. (1994). The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. Immunity *1*, 661–673.

Mu, P., Han, Y.**-C., Betel, D., Yao, E., Squatrito, M., Ogrodowski, P., de Stanchina, E., D‘Andrea, A.,** Sander, C., and Ventura, A. (2009). Genetic dissection of the miR-17~92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas. Genes Dev. *23*, 2806–2811.

Mullokandov, G., Baccarini, A., Ruzo, A., Jayaprakash, A.D., Tung, N., Israelow, B., Evans, M.J., Sachidanandam, R., and Brown, B.D. (2012). High-throughput assessment of microRNA activity and function using microRNA sensor and decoy libraries. Nat. Methods *9*, 840–846.

Napoli, M., and Flores, E.R. (2016). The p53 family orchestrates the regulation of metabolism: physiological regulation and implications for cancer therapy. Br. J. Cancer.

Nelson, E.A., Walker, S.R., Weisberg, E., Bar-Natan, M., Barrett, R., Gashin, L.B., Terrell, S., Klitgaard, J.L., Santo, L., Addorio, M.R., et al. (2011). The STAT5 inhibitor pimozide decreases survival of chronic myelogenous leukemia cells resistant to kinase inhibitors. Blood *117*, 3421– 3429.

O'Carroll, D., Mecklenbrauker, I., Das, P.P., Santana, A., Koenig, U., Enright, A.J., Miska, E.A., and Tarakhovsky, A. (2007). A Slicer-independent role for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNA pathway. Genes Amp Dev. *21*, 1999–2004.

O'Connell, R.M., Zhao, J.L., and Rao, D.S. (2011). MicroRNA function in myeloid biology. Blood *118*, 2960–2969.

O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Zeller, K.I., Dang, C.V., and Mendell, J.T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. Nature *435*, 839–843.

Olena, A.F., and Patton, J.G. (2010). Genomic Organization of microRNAs. J. Cell. Physiol. *222*, 540–545.

Ørom, U.A., Nielsen, F.C., and Lund, A.H. (2008). MicroRNA-**10a binds the 5'UTR of ribosomal** protein mRNAs and enhances their translation. Mol. Cell *30*, 460–471.

Ozsolak, F., Poling, L.L., Wang, Z., Liu, H., Liu, X.S., Roeder, R.G., Zhang, X., Song, J.S., and Fisher, D.E. (2008). Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. Genes Dev. *22*, 3172.

Paroo, Z., Ye, X., Chen, S., and Liu, Q. (2009). Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling. Cell *139*, 112–122.

Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degnan, B., Müller, P., et al. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. Nature *408*, 86–89.

Pekarsky, Y., and Croce, C.M. (2015). Role of miR-15/16 in CLL. Cell Death Differ. *22*, 6–11.

Peng, Y., and Croce, C.M. (2016). The role of MicroRNAs in human cancer. Signal Transduct. Target. Ther. *1*, 15004.

Petit, A.-P., Wohlbold, L., Bawankar, P., Huntzinger, E., Schmidt, S., Izaurralde, E., and Weichenrieder, O. (2012). The structural basis for the interaction between the CAF1 nuclease and the NOT1 scaffold of the human CCR4-NOT deadenylase complex. Nucleic Acids Res. *40*, 11058–11072.

Pfaff, J., Hennig, J., Herzog, F., Aebersold, R., Sattler, M., Niessing, D., and Meister, G. (2013). Structural features of Argonaute-GW182 protein interactions. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, E3770-3779.

Pfeffer, S.R., Yang, C.H., and Pfeffer, L.M. (2015). The Role of miR-21 in Cancer. Drug Dev. Res. *76*, 270–277.

Radich, J.P., Dai, H., Mao, M., Oehler, V., Schelter, J., Druker, B., Sawyers, C., Shah, N., Stock, W., Willman, C.L., et al. (2006). Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 2794–2799.

Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., and Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nat. Protoc. *8*, 2281–2308.

Rasmussen, K.D., Simmini, S., Abreu-Goodger, C., Bartonicek, N., Di Giacomo, M., Bilbao-Cortes, D., **Horos, R., Von Lindern, M., Enright, A.J., and O'Carroll, D. (2010). The miR**-144/451 locus is required for erythroid homeostasis. J. Exp. Med. *207*, 1351–1358.

Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans. Nature *403*, 901–906.

Ren, R. (2005). Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. Nat. Rev. Cancer *5*, 172–183.

van Rooij, E., Quiat, D., Johnson, B.A., Sutherland, L.B., Qi, X., Richardson, J.A., Kelm, R.J., and Olson, E.N. (2009). A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. Dev. Cell *17*, 662–673.

Shuai, K., Halpern, J., ten Hoeve, J., Rao, X., and Sawyers, C.L. (1996). Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. Oncogene *13*, 247–254.

Sillaber, C., Gesbert, F., Frank, D.A., Sattler, M., and Griffin, J.D. (2000). STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells. Blood *95*, 2118–2125.

Siminovitch, L., Mcculloch, E.A., and Till, J.E. (1963). THE DISTRIBUTION OF COLONY-FORMING CELLS AMONG SPLEEN COLONIES. J. Cell. Physiol. *62*, 327–336.

Simon, R., Lam, A., Li, M.-C., Ngan, M., Menenzes, S., and Zhao, Y. (2007). Analysis of Gene Expression Data Using BRB-Array Tools. Cancer Inform. *3*, 11–17.

Spiekermann, K., Bagrintseva, K., Schwab, R., Schmieja, K., and Hiddemann, W. (2003). Overexpression and constitutive activation of FLT3 induces STAT5 activation in primary acute myeloid leukemia blast cells. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *9*, 2140–2150.

Svobodova, E., Kubikova, J., and Svoboda, P. (2016). Production of small RNAs by mammalian Dicer. Pflugers Arch. *468*, 1089–1102.

Tritschler, F., Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2010). Role of GW182 proteins and PABPC1 in the miRNA pathway: a sense of déjà vu. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *11*, 379–384.

Varjosalo, M., and Taipale, J. (2008). Hedgehog: functions and mechanisms. Genes Dev. *22*, 2454– 2472.

Varnum-Finney, B., Halasz, L.M., Sun, M., Gridley, T., Radtke, F., and Bernstein, I.D. (2011). Notch2 governs the rate of generation of mouse long- and short-term repopulating stem cells. J. Clin. Invest. *121*, 1207–1216.

Wang, B., Hsu, S., Wang, X., Kutay, H., Bid, H.K., Yu, J., Ganju, R.K., Jacob, S.T., Yuneva, M., and Ghoshal, K. (2014). Reciprocal regulation of microRNA-122 and c-Myc in hepatocellular cancer: role of E2F1 and transcription factor dimerization partner 2. Hepatol. Baltim. Md *59*, 555–566.

Wang, L.-S., Li, L., Li, L., Chu, S., Shiang, K.-D., Li, M., Sun, H.-Y., Xu, J., Xiao, F.-J., Sun, G., et al. (2015a). MicroRNA-486 regulates normal erythropoiesis and enhances growth and modulates drug response in CML progenitors. Blood *125*, 1302–1313.

Wang, W.-Z., Pu, Q.-H., Lin, X.-H., Liu, M.-Y., Wu, L.-R., Wu, Q.-Q., Chen, Y.-H., Liao, F.-F., Zhu, J.-Y., and Jin, X.-B. (2015b). Silencing of miR-21 sensitizes CML CD34+ stem/progenitor cells to imatinib-induced apoptosis by blocking PI3K/AKT pathway. Leuk. Res. *39*, 1117–1124.

Warsch, W., Kollmann, K., Eckelhart, E., Fajmann, S., Cerny-Reiterer, S., Hölbl, A., Gleixner, K.V., Dworzak, M., Mayerhofer, M., Hoermann, G., et al. (2011). High STAT5 levels mediate imatinib resistance and indicate disease progression in chronic myeloid leukemia. Blood *117*, 3409–3420.

Westholm, J.O., and Lai, E.C. (2011). Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. Biochimie *93*, 1897–1904.

Witkos, T.M., Koscianska, E., and Krzyzosiak, W.J. (2011). Practical Aspects of microRNA Target Prediction. Curr. Mol. Med. *11*, 93–109.

Wojtowicz, E.E., Lechman, E.R., Hermans, K.G., Schoof, E.M., Wienholds, E., Isserlin, R., van Veelen, P.A., Broekhuis, M.J.C., Janssen, G.M.C., Trotman-Grant, A., et al. (2016). Ectopic miR-125a Expression Induces Long-Term Repopulating Stem Cell Capacity in Mouse and Human Hematopoietic Progenitors. Cell Stem Cell *19*, 383–396.

Xiong, L., Zhang, J., Yuan, B., Dong, X., Jiang, X., and Wang, Y. (2010). Global proteome quantification for discovering imatinib-induced perturbation of multiple biological pathways in K562 human chronic myeloid leukemia cells. J. Proteome Res. *9*, 6007–6015.

Yang, X.-P., Ghoreschi, K., Steward-Tharp, S.M., Rodriguez-Canales, J., Zhu, J., Grainger, J.R., Hirahara, K., Sun, H.-W., Wei, L., Vahedi, G., et al. (2011). Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5. Nat. Immunol. *12*, 247– 254.

Zeng, Y., and Cullen, B.R. (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. Nucleic Acids Res. *32*, 4776–4785.

Zhang, B., Pan, X., Cobb, G.P., and Anderson, T.A. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. Dev. Biol. *302*, 1–12.

Zhou, M., Zeng, J., Wang, X., Wang, X., Huang, T., Fu, Y., Sun, T., Jia, J., and Chen, C. (2015). Histone demethylase RBP2 decreases miR-21 in blast crisis of chronic myeloid leukemia. Oncotarget *6*, 1249–1261.

Zhou, X., Duan, X., Qian, J., and Li, F. (2009). Abundant conserved microRNA target sites in the 5'-untranslated region and coding sequence. Genetica *137*, 159–164.

Figure Legends

Figure 1. Regulation of miRNA expression by imatinib in K562 cells. Cells (n=3 independent wells for each sample) were either not treated (C) or treated for 24 h with 1 **µ**M imatinib (IMA) before RNA extraction, labeling and miRNA microarray hybridization. (A) Hierarchical clustering of the 6 independent microRNA expression profiles, revealing a strong molecular signature associated with the treatment. (B) Heatmap of the 13 significantly ($p<0.001$) dysregulated miRNAs. (C) Significativity (y axe) versus fold change (x axe) plot ; the most relevant candidates are depicted.

Figure 2. STAT5/3 binding sites are necessary for the action of imatinib on miR-21 promoter activity. A 517 bp fragment corresponding to the proximal *miR-21* promoter was cloned upstream of a Luciferase cds. (A) Relative positions of the STAT3/5 putative binding sites identified by Genomatix. (B) K562 cells were transfected with wild-type (WT), deleted or mutated variants of the miR-21 promoter, and treated or not with imatinib (1 **µ**M, 24h) before luciferase activity measurements. For each independent experiment, the normalized luciferase activities of the deleted/mutated variants were compared to the activity of the WT *miR-21* promoter. ***P<0.001, ** P <0.01 (variant versus WT miR-21 promoter); ### P <0.001 (imatinib-treated versus not treated cells).

Figure 3. Validation and effects of STAT5 knock down on miR-21 expression in K562 cells. Cells were transduced at a MOI of 5 with either STAT5 shRNA or control shRNA lentiviral vector and GFP^+ cells were sorted 48h later. (A) The expression of STAT5 was assessed by western blot analysis, confirming the efficacy of the STAT5 shRNA. (B), (C) MiR-21 was quantified in the transduced cells either directly by RT-qPCR (B) or indirectly (C) using a reporter "sensor" plasmid driving the transcription of luciferase cds fol^{low}ed by two miR-21 binding sites. (D) The knock-down of STAT5 abolished the imatinib-induced decrease of *miR-21* promoter activity in cells transfected with the *miR-21* promoter-luciferase plasmid. ***P<0.001, ** P <0.01 (control shRNA versus STAT5 shRNA); ## P <0.01 (imatinib-treated versus not treated cells).

Figure 4. Regulation of PDCD4 expression by imatinib in K562 cells. (A) The proteome of cells that were not treated (n=2) or treated with imatinib (1 **µ**M, 24h, n=2) was studied using iTRAQ. A total of 1134 proteins were identified and quantified by MS/MS. For each protein (one spot on the graph), the base 2 logarithm of the ratio of its levels in the two samples (IMA/C) is plotted on the y axe. A western blot analysis

of PDCD4 expression in control and treated cells confirmed the result observed using proteomics (inset). (B) western blot analysis of PDCD4 expressed in cells transfected by a control LNA, a miR-21 mimic or an anti-miR-21 LNA. (C) western blot analysis of PDCD4 expressed in normal (WT) or miR-21 KO K562 cells (5A, 7B) (D) Luciferase activities of K562 cells co-transfected with (i) plasmids bearing the firefly luciferase cds fol^{low}ed by a 554 bp fragment of the PDCD4 3'UTR containing (WT) or not (Deleted) a miR-21 binding site and (ii) antimiR-21-LNA, miR-21 mimic or control LNA oligonucleotides.

Figure 5. Effect of imatinib on the expression of miR-21 and PDCD4 in CML CD34^{+} cells. (A) miR-21 and PDCD4 mRNA were quantified by RT-qPCR on CD34^{+} cells prepared from four CML donors and treated (5**µ**M, 24h) or not with imatinib. For each CML donor, histograms represent the base 2 logarithm of the ratio (treated/not treated cells). (B) CD34^{+} cells from a CML patient were transduced with a lentivirus carrying a firefly luciferase cds cloned downstream of the *miR-21* promoter, then treated or not treated with imatinib. Luciferase activity was measured after 4, 8 or 24 hours. (C) phospho-STAT5 and STAT5 were detected by western blot of protein extracts from CML CD34^{+} not treated or treated with imatinib.

Figure 6. Effect of TKI treatment on the expression of miR-21 and PDCD4 in AML cells lines. (A) MV4.11 and MOLM13 cells were treated with Sunitinib (0.1**µ**M, 24h). Then, PDCD4 mRNA and miR-21 were quantified by RT-qPCR, and *miR-21* promoter activity was assessed by luciferase measurements in cells transduced with the *miR-21* promoter-Luciferase lentivirus. For each cell line, histograms represent the base 2 logarithm of the ratio (treated/not treated cells). (B) phospho-STAT5 levels were assessed in control (-) or TKI-treated ($^{+}$) MV4.11 (left) and MOLM13 (right) cells. (C) Luciferase was measured in MOLM13 cells 24 hours after transfection with pGL4.10 plasmids having no promoter, WT or mutated *miR-21* promoters.

Figure 1

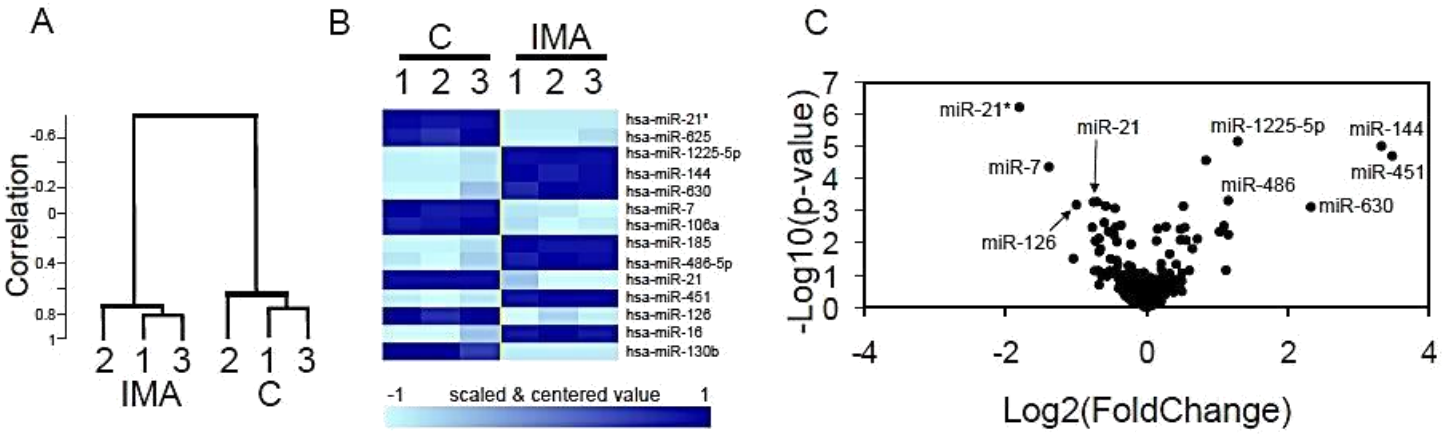

A
Correlation
-0.6
-0.2
0
0.4
0.8
1
2 1 3 2 1 3
IMA C
B
C IMA
1 2 3 1 2 3
hsa-miR-21*
hsa-miR-625
hsa-miR-1225-5p
hsa-miR-144
hsa-miR-630
hsa-miR-7
hsa-miR-106a
hsa-miR-185
hsa-miR-486-5p
hsa-miR-21
hsa-miR-451
hsa-miR-126
hsa-miR-16
hsa-miR-130b
-1 scaled & centered value 1
C
-Log10(p-value)
0 1 2 3 4 5 6 7
miR-21*
miR-21
miR-1225-5p
miR-144
miR-7
miR-451
miR-486
miR-630
miR-126
-4 -2 0 2 4
Log2(FoldChange)

Figure 2

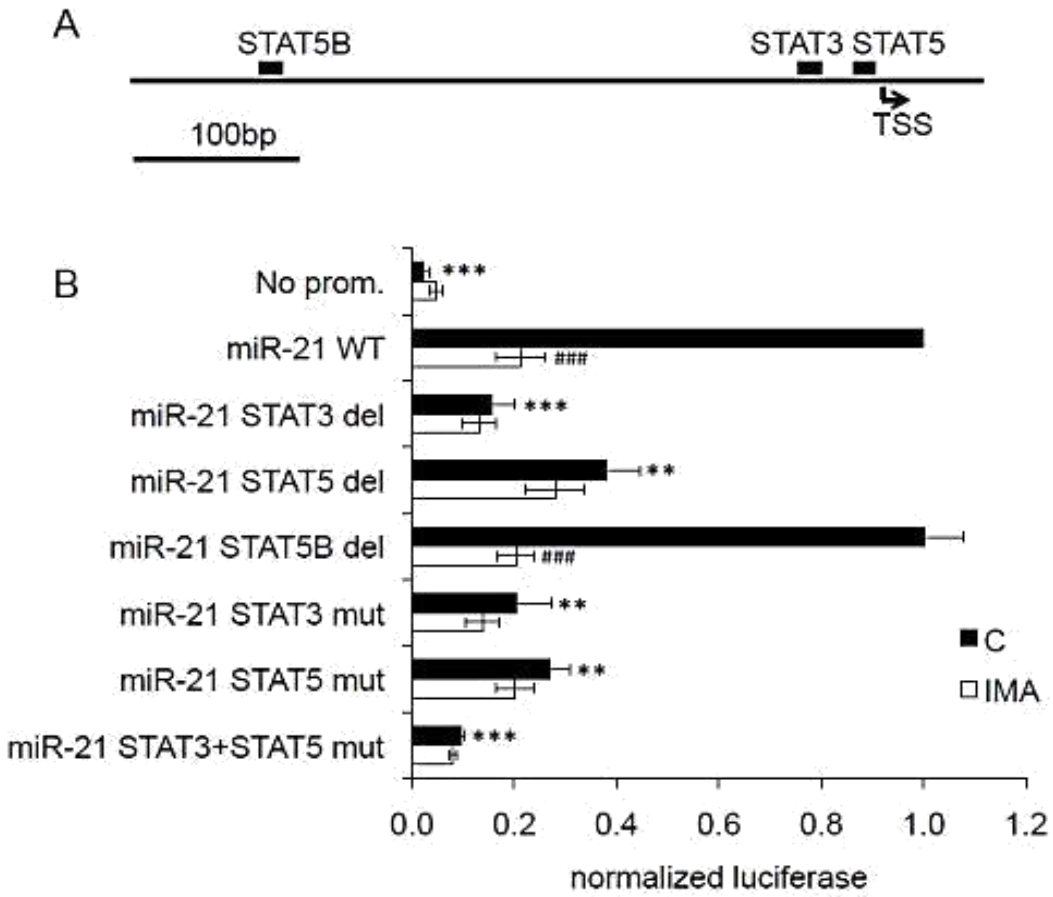

A
STAT5B
STAT3 STAT5
TSS
100bp
B
No prom.
miR-21 WT
miR-21 STAT3 del
miR-21 STAT5 del
miR-21 STAT5B del
miR-21 STAT3 mut
miR-21 STAT5 mut
miR-21 STAT3+STAT5 mut
***
###
***
**
###
**
**
***
C
IMA
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
normalized luciferase

Figure 3

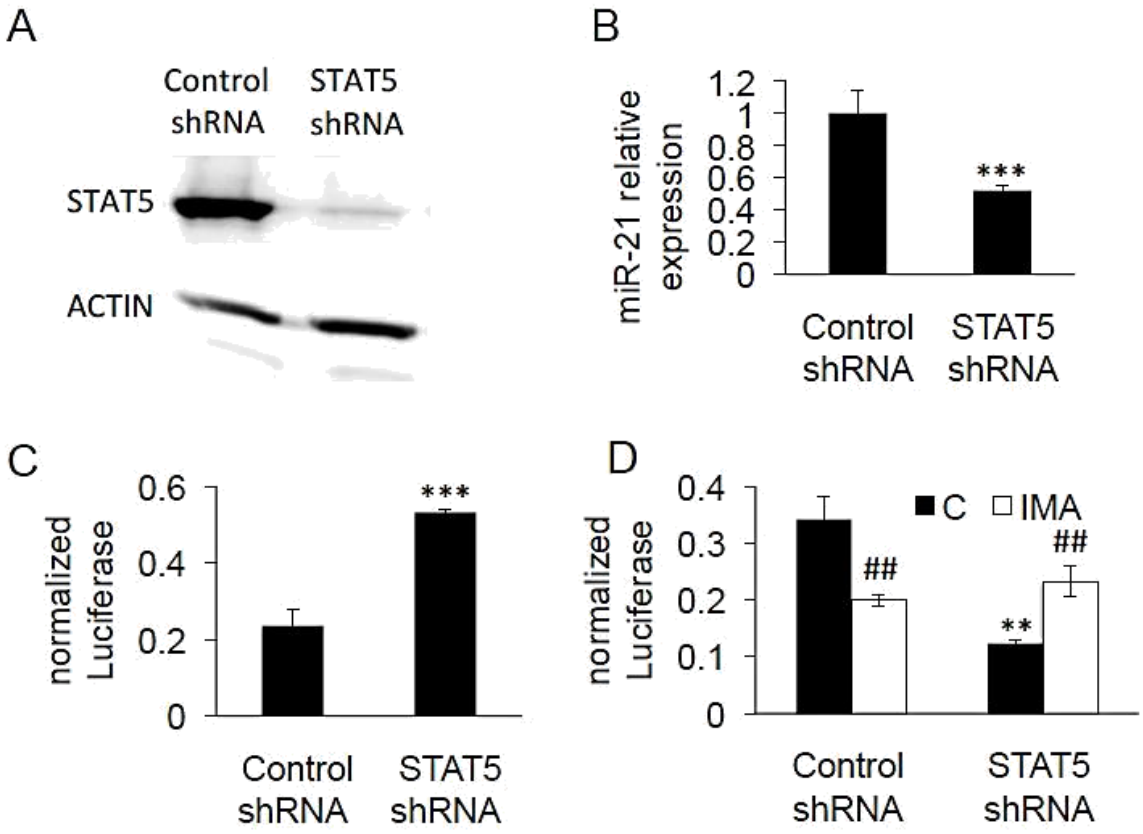

A
Control shRNA
STAT5 shRNA
STAT5
ACTIN
B
miR-21 relative expression
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
***
Control shRNA
STAT5 shRNA
C
normalized Luciferase
0.6
0.4
0.2
0
***
Control shRNA
STAT5 shRNA
D
normalized Luciferase
0.4
0.3
0.2
0.1
0
C
IMA
##
**
##
Control shRNA
STAT5 shRNA

Figure 4

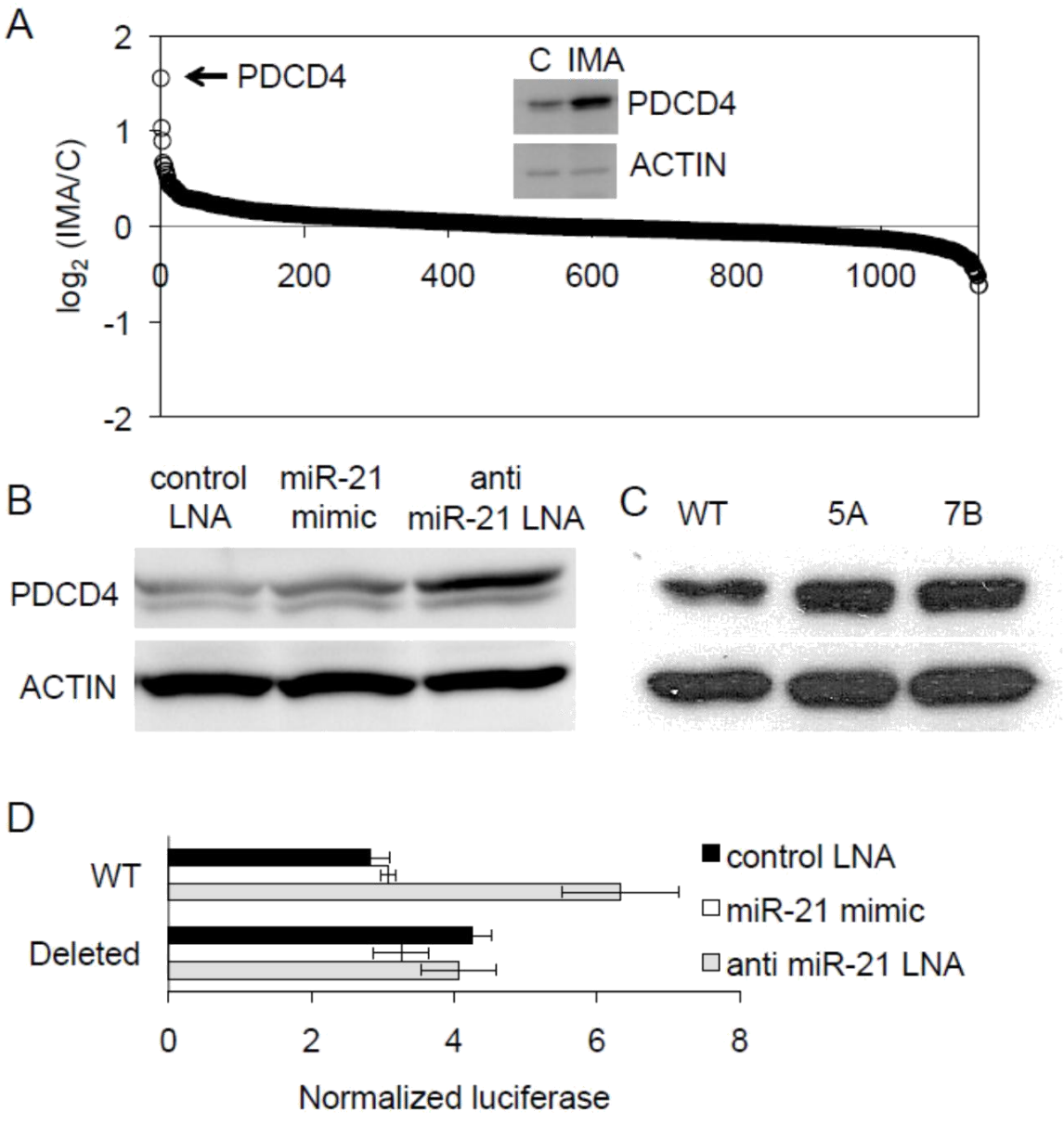

A
PDCD4
C IMA
PDCD4
ACTIN
log2 (IMA/C)
2
1
0
-1
-2
0
200
400
600
800
1000
B
control LNA
miR-21 mimic
anti miR-21 LNA
PDCD4
ACTIN
C
WT
5A
7B
D
WT
Deleted
control LNA
miR-21 mimic
anti miR-21 LNA
0
2
4
6
8
Normalized luciferase

Figure 5

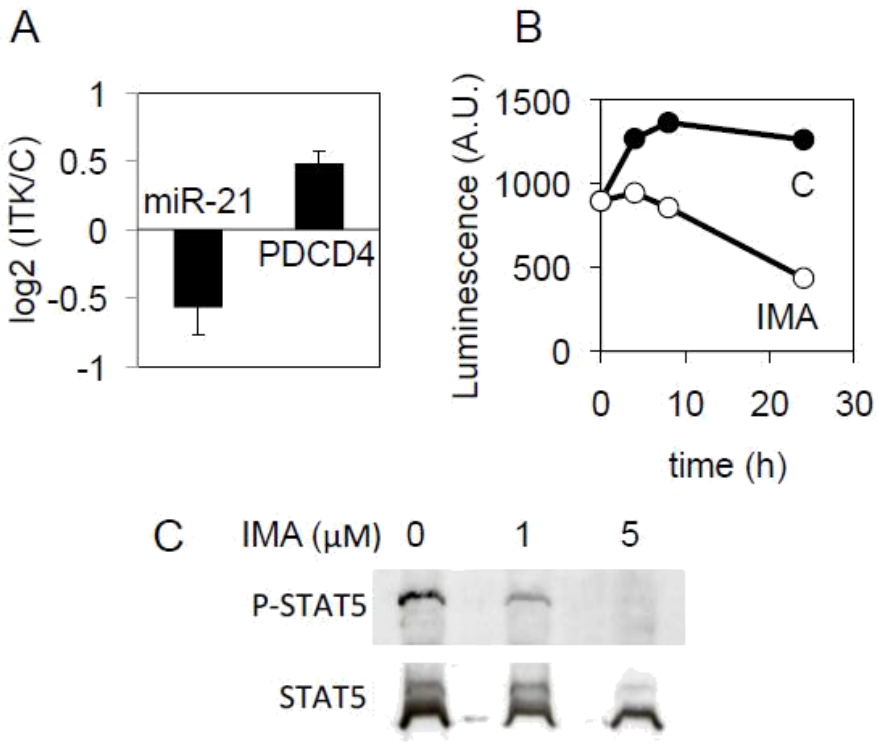
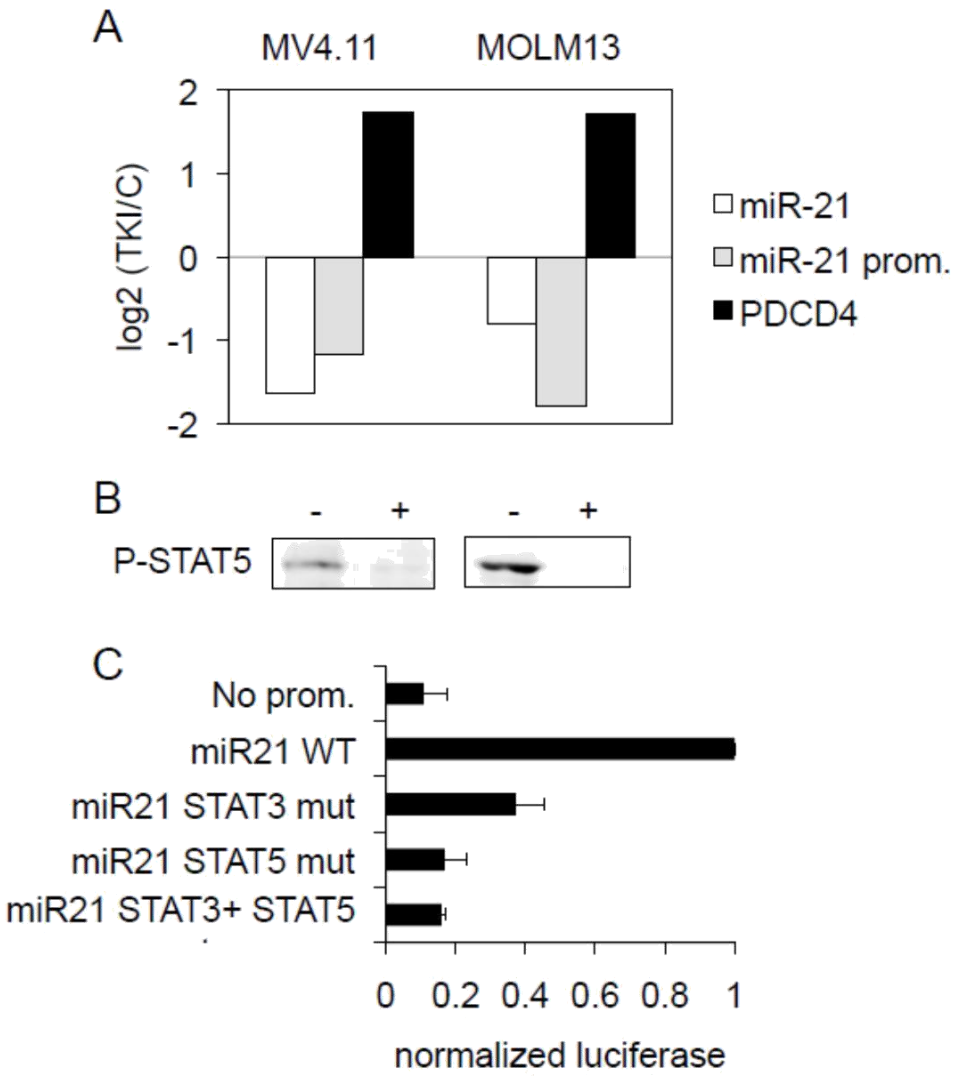

A
log2 (ITK/C)
1
0.5
0
-0.5
-1
miR-21
PDCD4
B
Luminescence (A.U.)
1500
1000
500
0
C
IMA
0
10
20
30
time (h)
C
IMA (μM) 0 1 5
P-STAT5
STAT5

Figure 6

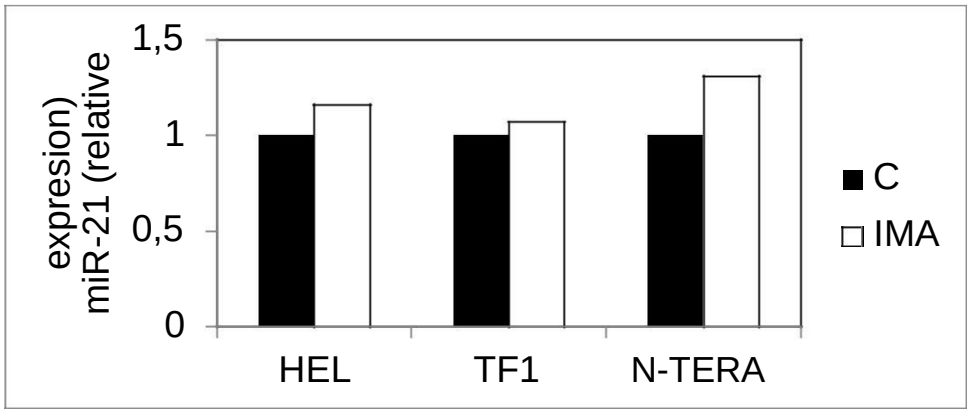

A
MV4.11
MOLM13
log2 (TKI/C)
2
1
0
-1
-2
miR-21
miR-21 prom.
PDCD4
B
- + - +
P-STAT5
C
No prom.
miR21 WT
miR21 STAT3 mut
miR21 STAT5 mut
miR21 STAT3+ STAT5
0 0.2 0.4 0.6 0.8 1
normalized luciferase

Supplementary datas

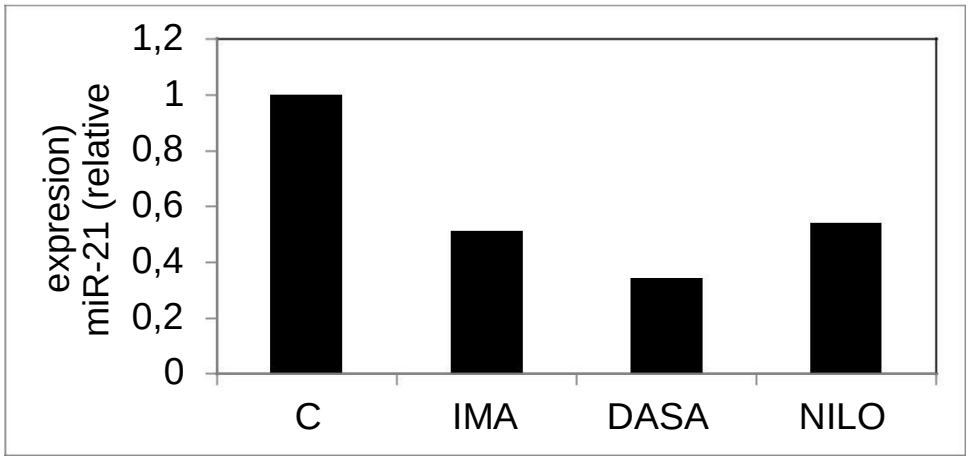
```
                1                                                   50
WT              CGGTTTAACA GCACTGCCTC CATGTATTCT GGGTAAGAAG GAGCTCCGAG
STAT3del        ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT5del        ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT5Bdel       ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT3mut        ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT5mut        ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT3+STAT5mut  ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

               51                                                  100
WT              TACATAAATT TATCAAAGAT CACTATCCCA ATCATCTCAG AACAAGCTGT
STAT3del        ---------- ---------- ---------- ----------- ----------
STAT5del        ---------- ---------- ---------- ----------- ----------
STAT5Bdel       ---------- ---------- ---------- ---....... .......---
STAT3mut        ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT5mut        ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT3+STAT5mut  ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

               101                                                 150
WT              TACTAATGTA CTGGAGTTTC TGTGCAAACT GTCTACCATA AACCATGAAA
STAT3del        ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT5del        ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT5Bdel       ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT3mut        ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT5mut        ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT3+STAT5mut  ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

               151                                                 200
WT              GGATTCAAAG TTCATAGTTC CTTCTTTGTT CCTTTGTTAA TCACTGACTT
STAT3del        ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT5del        ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT5Bdel       ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT3mut        ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT5mut        ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT3+STAT5mut  ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

               201                                                 250
WT              CTGACTAGTG GGAGGTGCCT CCCAAGTTTG CTAATGCATT CTTTTTGGAT
STAT3del        ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT5del        ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT5Bdel       ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT3mut        ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT5mut        ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT3+STAT5mut  ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

               251                                                 300
WT              AAGGATGACG CACAGATTGT CCTAATAAGG ACTTAGATTG AGAAAGACCG
STAT3del        ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT5del        ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT5Bdel       ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT3mut        ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT5mut        ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT3+STAT5mut  ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

               301                                                 350
WT              CCCCCTCTGA GAAGAGGGGA CAAGTCAGAG AGAGGGCGGG CAGTTTCTTT
```

```
STAT3del          ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT5del          ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT5Bdel         ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT3mut          ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT5mut          ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT3+STAT5mut    ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

                  351                                              400
WT                TTTAACTAGG GATGACACAA GCATAAGTCA TTTCCTTATT AATTGGTTCA
STAT3del          ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT5del          ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT5Bdel         ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT3mut          ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT5mut          ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT3+STAT5mut    ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

                  401                                              450
WT                AACCAGTTCT TACAGGAACT AGTGGTGATA AATGTGGGAC TTCTGAGAAG
STAT3del          ---------. .......... .--------- ---------- ----------
STAT5del          ---------- ---------- ---------- --------.. ..........
STAT5Bdel          -      -- ---------- -----      ---------- ----------
STAT3mut          ---------- -----CT--- ---------- ---------- ----------
STAT5mut          ---------- ---------- ---------- ---------- -AG-------
STAT3+STAT5mut    ---------- -----CT--- ---------- ---------- -AG-------

                  451                                              500
WT                TCATTCATTT TATTCTTTGT GCCATACCAG AGTACAGTAT CAGCTGAGCT
STAT3del          ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT5del          .....----- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT5Bdel         ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT3mut          ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT5mut          ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
STAT3+STAT5mut    ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

                  501            517
WT                GACCTTACTC TGAGGAC
STAT3del          ---------- -------
STAT5del          ---------- -------
STAT5Bdel         ---------- -------
STAT3mut          ---------- -------
STAT5mut          ---------- -------
STAT3+STAT5mut    ---------- -------
```

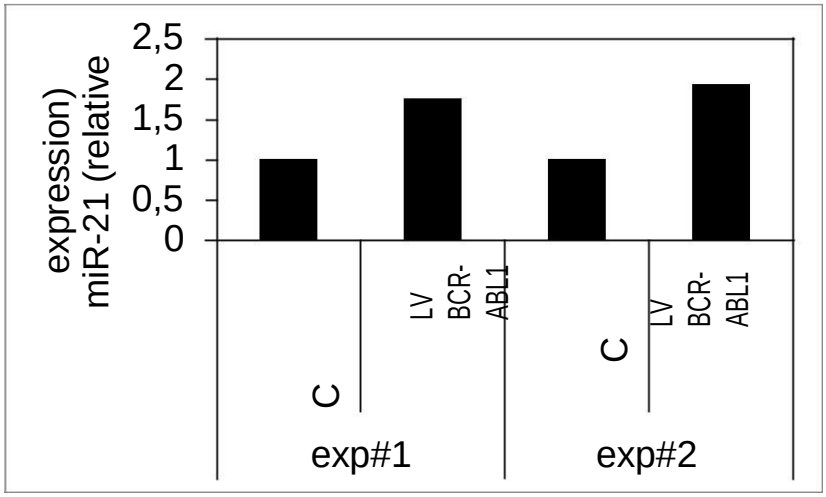
S1 Fig. Alignment of the deleted and mutated variants of the *miR-21* promoter. The STAT5B (position 84-92), STAT3 (position 410-418) and STAT5 (position 441-449) sites predicted by Genomatix are depicted in grey in the WT sequence. Deletions or mutations were produced by PCR and sequence-verified.



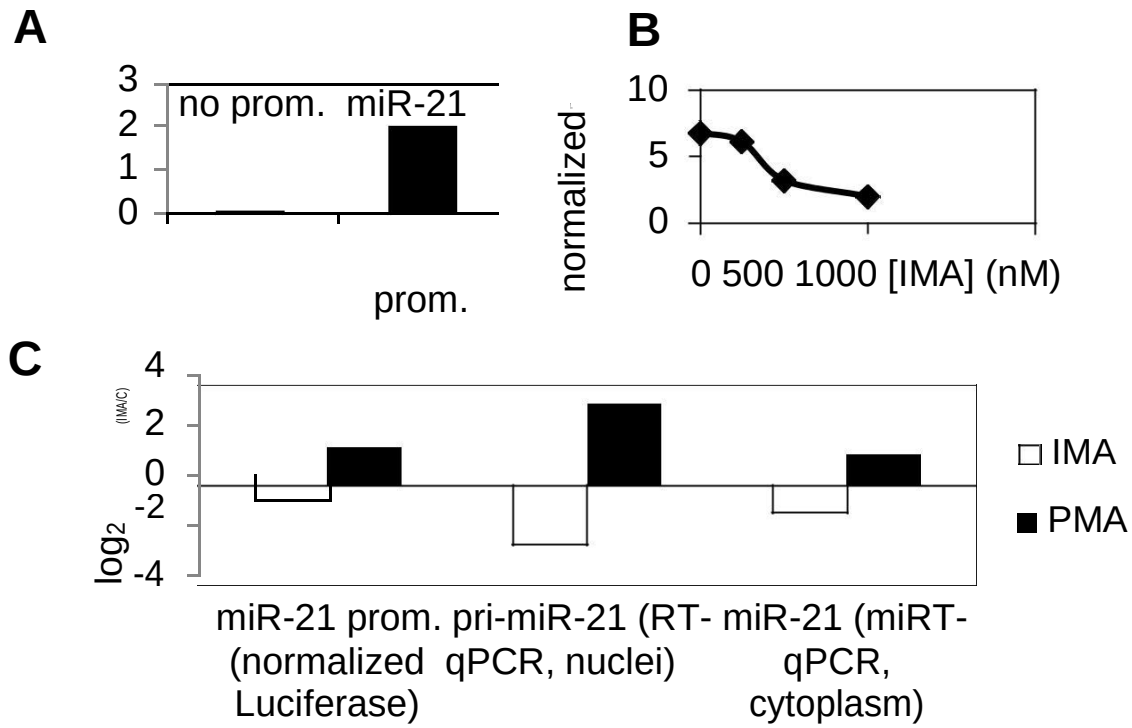
S2 Fig. Lack of effects of imatinib on BCR-ABL1-negative cell line. The AML cell lines HEL, TF1 and the teratoma cell line N-TERA were treated with imatinib (1 µM, 24 h) before RNA extraction and miR-21 quantification by RT-qPCR.



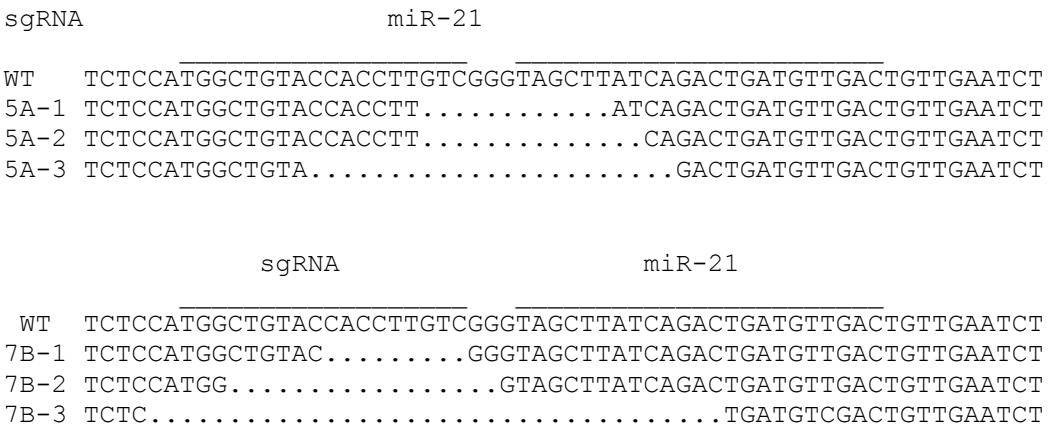
S3 Fig. Regulation of miR-21 by three tyrosine-kinase inhibitors in K562. Cells were either not treated (C) or treated for 24h with imatinib (1 µM), dasatinib (10nM) or nilotinib (20 nM). miR-21 was quantified by RT-qPCR



S4 Fig. Increased expression of miR-21 induced by BCR-ABL1 expression. miR-21was quantified by RT-qPCR in iPS cells produced from $CD34^{+}$ cells that were transduced or not with a BCR-ABL1-expressing lentivirus. Exp#1 and exp#2 represent the results from two independent experiments



S5 Fig. Validation of the miR-21 promoter activity in K562 cells. (A) K562 cells were transfected with a luciferase plasmid containing either no promoter (no prom) or the 517bp fragment derived from the *miR-21* gene (miR-21 prom). The luciferase levels expressed by the transfected cells confirm the promoter activity of the cloned fragment. (B) On cells transfected with the miR-21 promoter-luciferase plasmid, increasing concentrations of imatinib induce a dose-dependent decrease of the luciferase activity. (C) The effect of imatinib (1**μ**M) and Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (10nM) were assessed using three independent measurements of miR-21 expression: luciferase activity of transfected cells (left), pri-miR-21 (center) and mature miR-21 (right).



S6 Fig. CRISPR/Cas9-induced deletions in the *miR-21* gene. K562 were transiently transfected with the sgRNA/Cas9/Puro plasmid and selected for 48 h with puromycin. After cloning in semi-solid medium, clones were picked up and grown. A portion of the miR-21 gene was PCR-amplified from the genomic DNA of two clones (5A and 7B). PCR products were cloned into the pCR2.1-TOPO vector, and a total of 24 plasmids were sequenced (12 for 5A and 12 for 7B). The different sequences obtained are aligned. The positions of the hybridization site of the shRNA, and of miR-21 are shown.

III. Discussion

Dans cet article, nous avons montré que l'imatinib a bien un effet sur l'expression de plusieurs microARN et protéines dans la lignée cellulaire K562 portant l'anomalie chromosomique Philadelphie (lignées Ph^+). Dans un premier temps, nos résultats mettent en évidence la régulation significative du microARN miR-21 et de la protéine PDCD4 suggérant leurs rôles possibles dans les effets de BCR-ABL1. Le gène suppresseur de tumeur PDCD4 est une cible bien caractérisée de miR-21, et la fonctionnalité de cette régulation négative a notamment déjà été démontrée dans un modèle de cancer colorectal[90]. D'autre part, notre étude suggère que miR-21 est régulé transcriptionnellement par BCR-ABL1 par l'intermédiaire du facteur de transcription STAT5, élément central des effets de BCR-ABL1 dans les cellules Ph^+. Comme cela a été montré dans plusieurs autres modèles, nous confirmons également que miR-21 est bien capable de réguler négativement PDCD4 dans ces cellules. Nous avons montré que cette régulation semble effective dans des cellules primaires de patients LMC sensibles à l'imatinib. Enfin, nous avons cherché à généraliser ces modalités de régulation à un modèle de leucémie différent. En effet, nos expériences suggèrent que la régulation de miR-21 par STAT5 semble également effective dans des lignées modèles de LAM présentant une mutation FLT3-ITD dont la dérégulation de l'activité tyrosine-kinase peut être comparée à celle de BCR-ABL1, puisqu'elle aboutit entre autre à la phosophorylation de STAT5.

Cet article a fait l'objet d'une soumission au journal *Oncotarget* au mois d'Août 2016. L'éditeur nous a encouragé à re-soumettre une version complétée en tenant compte des remarques et suggestions des *reviewers*. Cette discussion apporte des éléments de réponses à ces remarques: précisions sur la régulation de miR-21 par le facteur de transcription STAT5, données complémentaires concernant un possible rôle fonctionnel de miR-21, et modalités de régulations de PDCD4 dans nos modèles diférents modèles.

1. Mise en évidence de l'intermédiaire de régulation entre BCR-ABL1 et miR-21

Le gène *miR-21* est décrit en positon intronique au sein du gène *TMEM49* porté par le chromosome 17[87]. Ce microARN est l'un des premiers à avoir été étudié dans la

démonstration de la transcription des microARN par l'ARN polymérase de type II [87]. Chen et al. montrent que comme la majorité des microARN, miR-21 semble jouer un rôle important dans les premiers stades du développement dans son modèle choisi du zebrafish[258]. Exprimé de façon ubiquitaire, Kumarsy et al. suggèrent également qu'il joue un rôle dans le maintien physiologique de l'état actif des lymphocytes T[231].

Actuellement, relativement peu de données sont à notre disposition pour décrire le rôle physiologique de miR-21 alors que des centaines de publications suggèrent son potentiel oncogénique fort dans plusieurs modèles pathologiques. En effet, les études de Volina et al., montrent pour la première fois que sa surexpression est quasi systématique dans la majorité des tumeurs solides et liquides étudiées[82]. Plusieurs données de méta-analyses reprises récemment à partir d'une dizaine de publications se basant sur la comparaison d'échantillons de patients et de sujets sains proposent même d'utiliser ce microARN comme biomarqueur universel de diagnostic des cancers, d'outils de prognostic et marqueur de résistance[204,259]. Ce contexte justifie ainsi l'intérêt majeur de comprendre les modalités de régulation de ce microARN, et de mieux comprendre sa place au sein des mécanismes de l'oncogenèse.

a. *Généralités sur la régulation de miR-21*

D'après la littérature, la surexpression de miR-21 dans les cancers semble majoritairement dûe à une régulation soit transcriptionnelle soit post-transcriptionnelle, puisqu'aucun cas d'amplification génique n'a été rapporté pour ce microARN. Cullens et al. sont les premiers à décrire la région promotrice de mir-21, complétée plus tard par l'étude de Löffler et al., démontrant la régulation cytokine dépendante (IL-6) de miR-21 *via* le facteur de transcription STAT3[239]. Dans le même temps, Fujita et al. apportent des précisions quant aux facteurs de transcription régulant miR-21 avec l'identification de sites de fixations des facteurs AP-1, PU-1, p53, SRF, NFI et STAT3 dans son promoteur[234]. Cependant, il est important de noter que ce promoteur peut potentiellement être régulé négativement par les facteurs de transcription C/EBPα et Gfi1. Les facteurs formellement identifiés ou prédits sont généralement des effecteurs de voies de signalisations dépendantes de cytokines. Ribas et al. montrent dans les modèles de cancer de la prostate que miR-21 semble également soumis à une régulation hormono-dependante, *via* la fixation de facteurs de transcriptions stimulés par les androgènes et les œstrogènes[260].

En complément des régulations transcriptionnelles, Davis et al. montrent qu'il existe également une régulation post-transcriptionnelle de miR-21 par les facteurs TGFβ et BMP4, qui agissent au niveau des premières étapes de la maturation du pri-miR[261]. D'autre part, le recrutement de protéines SMAD au niveau du complexe *microprocessor* peut aussi conduire à une maturation accélérée du précurseur secondaire (pre-miR) de miR-21[262].

Notre étude suggère que dans les cellules K562, BCR-ABL1 exerce une régulation transcriptionnelle de miR-21 puisque le traitement par l'imatinib conduit à une régulation à la fois de sa forme mature, mais aussi de sa forme précurseur (pri-miR). Afin d'identifier l'intermédiaire de régulation, nous avons choisi de cloner une zone promotrice de miR-21 proche de celle décrite par Fujita et al. (et comprenant des sites communs à la description de Löffler et al.)[234,239]. En effet, l'étude d'Ozsolak et al. démontre que cette zone semble correspondre à une région de régulation forte de miR-21 et non lignée-dépendante[14]. D'autre part, notre étude montre par un traitement imatinib sur des lignées transfectées avec la construction promoteur miR-21-luciférase que cette séquence porte bien les éléments de régulation nécessaires aux effets de BCR-ABL1 (Article : figure S5.c). L'analyse bioinformatique de la séquence promotrice clonée a été effectuée avec le logiciel de prédiction Genomatix®, capable de générer une liste des différents sites de fixations présents dans une séquence proposée en fonction des motifs consensuels déjà publiés. Les résultats présentés dans l'article en figure 2.a montrent la présence d'un site de fixation pour le facteur STAT5B en position 5', et deux sites permettant à la fois la fixation des facteurs STAT3 et STAT5 (appelés STAT3/5) en position 3'. Ces régions palindromiques avaient été déjà décrites dans les études de Fujita et al. et de Loffler et al. comme étant des sites strictement STAT3. Nos résultats ont ainsi montré par mutagenèse dirigée que l'intégrité des sites STAT3/5 semble être indispensable à la régulation du promoteur par BCR-ABL1, puisque leur délétion/mutation ne permet plus d'observer la réponse induite par le traitement imatinib dans la lignée K562-Ph^+ (Article : figure 2.b). D'autre part, la mutagenèse du site STAT5B ne semble pas avoir d'impact sur la régulation du promoteur. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que contrairement aux sites STAT3/5, la séquence STAT5B identifiée par Genomatix® ne présente pas de structure palindromique et sa séquence ne semble pas aussi proche du motif de reconnaissance consensuellement décrit pour les membres de la famille STAT.

b. *Les facteurs STATs*

La famille des *Signal transducers and activators of transcription* (STAT) regroupe 7 membres (STAT1-4, 5a, 5b, 6) [263]. Leur fonction réside principalement dans leur capacité à se dimériser suite à leur phosphorylation, et à transloquer dans le noyau dans lequel ils vont activer ou de réprimer l'expression de gènes cibles[263]. Cette phosphorylation est régie par la stimulation cytokine-dépendante des protéines cytosoliques à activité tyrosine kinase JAK1, JAK2, ou JAK3. Ce processus d'activation est rapide et fonctionnel en quelques heures seulement[263].

Le motif de reconnaissance principal est la séquence palindromique « TTCNNNGAA ». La structure similaire des membres de la famille STAT leur permet de s'homodimériser ou de s'hétérodimériser suite à leur phosphorylation.

Cependant, leurs fonctions ne sont pas redondantes et chaque facteur STAT possède des gènes cibles et des fonctions spécifiques[263]. Ainsi, le facteur STAT1 joue un rôle important dans la réponse innée du système immunitaire, tandis que les membres STAT2, 4 et 6 semblent jouer un rôle précisément dans la maturation des lymphocytes T[180,263]. Les rôles de STAT3 et de STAT5a/b semblent principalement concerner la régulation de l'hématopoïèse et l'orientation des cellules au cours de leur différenciation myéloïde et lymphoide. Le rôle plus affirmé de STAT5a/b dans la régulation des processus cellulaires et d'apoptose lui confère une fonction plus importante dans le maintien du pool des cellules souches hématopoiétiques [180,263,264].

Les facteurs STAT3 et STAT5 sont majoritairement étudiés dans le contexte du cancer puisque leurs phosphorylations aberrantes ou leurs surexpressions sont largement rapportées dans de nombreux modèles (sein, ovaire, prostate, poumon, pancréas, et maladie hématologiques)[181,265].Ils semblent principalement jouer un rôle dans la survie et la prolifération des cellules transformées. Ces fonctions apparemment redondantes s'expliquent par la similitude de certains de leurs gènes cibles anti-apoptotiques tels que Bcl_{xl}, *Mcl1* et *pim1* [81,265]

c. *Détermination de STAT5 comme élément moteur de la régulation de miR-21*

L'analyse bioinformatique du promoteur de miR-21 a révélé la présence de deux sites consensus de fixation des facteurs STAT3 et STAT5. Un petit nombre

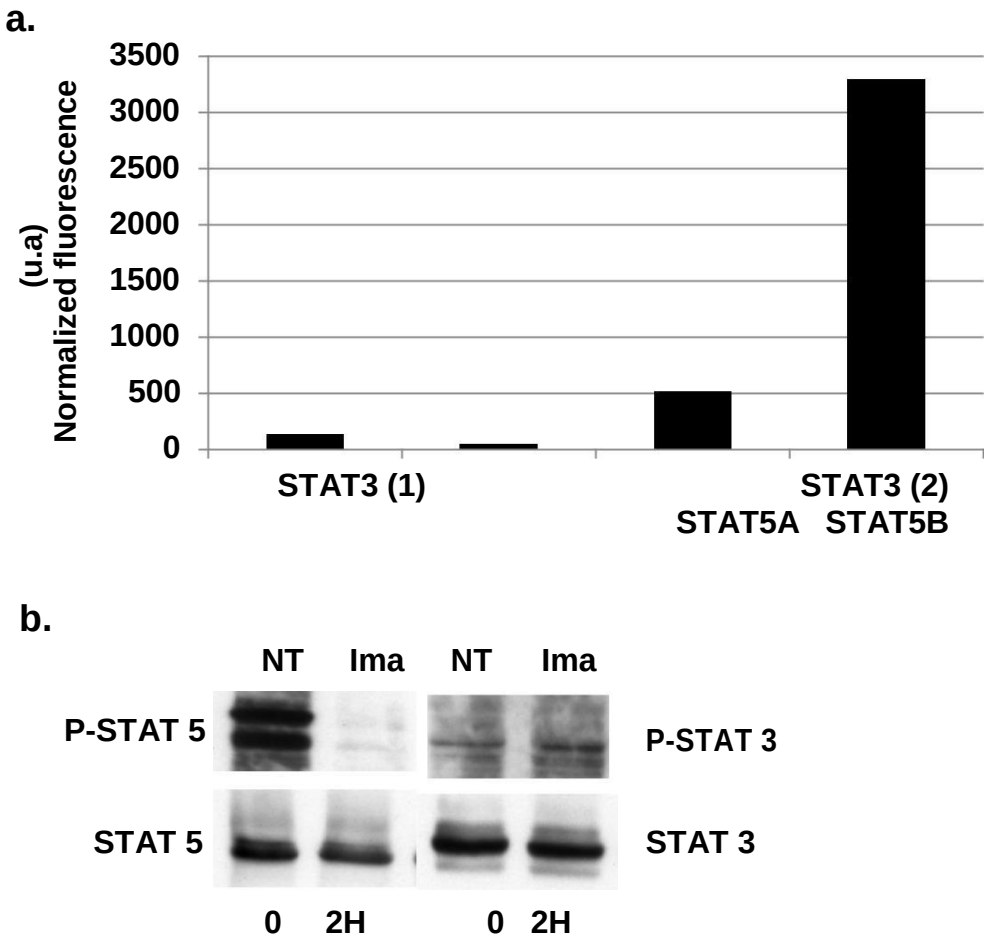


Figure 14. Expression et activation différentielle des facteurs STAT3 et STAT5 dans les cellules K562

a. Résultats d'analyses transcriptomiques effectuées sur la lignées K562. expression de la fluorescence normalisée en unité arbitraire (u.a)

b. *Westernblot* des protéines STAT3 et STAT5. Effet du traitement par l'imatinib (1µM) sur la phosphorylation des protéines.

d'études a récemment suggéré que ces deux facteurs sont des régulateurs potentiels de miR-21. En effet, miR-21 a été identifié comme cible potentielle de STAT3 dans les gliomes, les myélomes, le cancer de la prostate et le syndrome de Sezary[266–268], tandis que le lien avec STAT5 a plus rarement été démontré dans des contextes du développement mammaire, de lymphomes et de régulation du système immunitaire[237,238]. L'une des remarques majeures portées les *reviewers* a donc été de justifier l'orientation de notre étude spécifiquement sur l'importance du facteur STAT5 alors que STAT3 avait déjà été décrit comme potentiellement indispensable à la régulation de miR-21 dans d'autres modèles que la LMC.

L'étude de Hantschel et al. démontre d'abord que l'activation de STAT5 est indépendante à JAK2 puisque BCR-ABL1 est capable de le phosphoryler[241]. D'autre part, la délétion de JAK2 n'impacte en rien la progression de la LMC sur des modèles murins, suggérant que les cibles indirectement phosphorylées par BCR-ABL1 (comme le facteur STAT3) présentent une importance moindre dans le mécanisme d'action de BCR-ABL1. Les études de Weber et al. et de Warsch al. ajoutent également que la présence de STAT3 et de STAT5 est nécessaire au développement de la LMC, mais que seul STAT5 est indispensable à la survie et la prolifération des cellules de lignées de LMC[254,269]. D'autre part, les analyses transcriptomiques effectuées dans notre laboratoire sur des lignées Ph^+ K562 révèlent que l'expression de STAT5 est plus importante que le facteur STAT3 (figure 14.a). De plus, l'analyse de l'effet de l'imatinib sur la phosphorylation de STAT3 que nous avons effectué (figure 14.b) montre que le traitement a peu ou pas d'impact sur la phosphorylation de STAT3, suggérant qu'il ne semble pas jouer un rôle important dans la régulation de miR-21 dans ce modèle.

2. Analyse fonctionnelle de miR-21

a. *miR-21, un exemple d'oncomicroARN*

Les fonctions de miR-21 et ses ARNm cibles ont d'abord été démontrées dans plusieurs modèles de lignées. Wickramasinghe et al. sont les premiers à suggérer que les cibles identifiées de miR-21, telles que PDCD4, PTEN ou Bcl2, semblent systématiquement pro-apoptotiques ou associées à la régulation du cycle cellulaire[270]. D'autre part, la revue de Jazubutyte et al. montre que les cibles de miR-21 prédites par

analyses bioinformatiques semblent associées aux voies de signalisation oncogéniques[271]. Au-delà des études *in vitro*, les études *in vivo* de Medina et al. et de Hatley et al., ont également clairement montrés le rôle oncogénique de miR-21 dans des modèles de lymphome et du cancer du poumon[91,272]. En effet, Medina et al., utilise un système inductible par tet-off et cre-recombinase pour permettre une expression de miR-21 restreinte aux cellules hématopoiétiques (*via* un promoteur Nestine) dont l'induction est contrôlée par la doxycycline. La surexpression induite de miR-21 conduit ainsi à la formation de tumeurs lymphoïdes des cellules de type B, tandis que son inactivation induit la diminution rapide des tumeurs néoformées[91]. Le second exemple de Hatley et al. suggère que la délétion du gène miR-21 dans un modèle de
lignée de cancer du poumon, ainsi que dans un modèle murin, supprime l'activation de
la voie K-RAS oncogénique, responsable de la transformation des cellules[272]. Ces deux exemples montrent le potentiel oncogénique fort de miR-21 et, de façon encore plus intéressante, la notion d'addiction potentielle des cellules cancéreuses à ce microARN.

b. *miR-21, un effecteur de STAT5*

La surexpression de miR-21 a déjà été caractérisée dans la LMC depuis les analyses de Volina et al. et de Lu et al.[82,221]. Cependant, malgré son potentiel oncogénique avéré, relativement peu de publications décrivent une fonction claire de cette surexpression dans le modèle de la LMC. En effet, les quelques études effectuées à travers l'utilisation d'oligonucléotides antisens suggèrent que miR-21 semble, de façon attendue, important dans la régulation de la réponse apoptotique mais aussi dans la sensibilisation des cellules aux ITK dans des lignées modèles de LMC[251,252]. Une seule publication à ce jour confirme ce rôle dans les $CD34^+$ de patients LMC[204].

De la même façon, STAT5 est connu pour être un effecteur central et indispensable dans le maintien et la protection des cellules Ph^+. Actuellement considéré comme une cible thérapeutique potentielle, le knock-down (KD) de STAT5 ou son ciblage pharmacologique conduit à une augmentation de la réponse apoptotique et à une sensibilisation des cellules Ph^+ aux ITK[254,273,274].

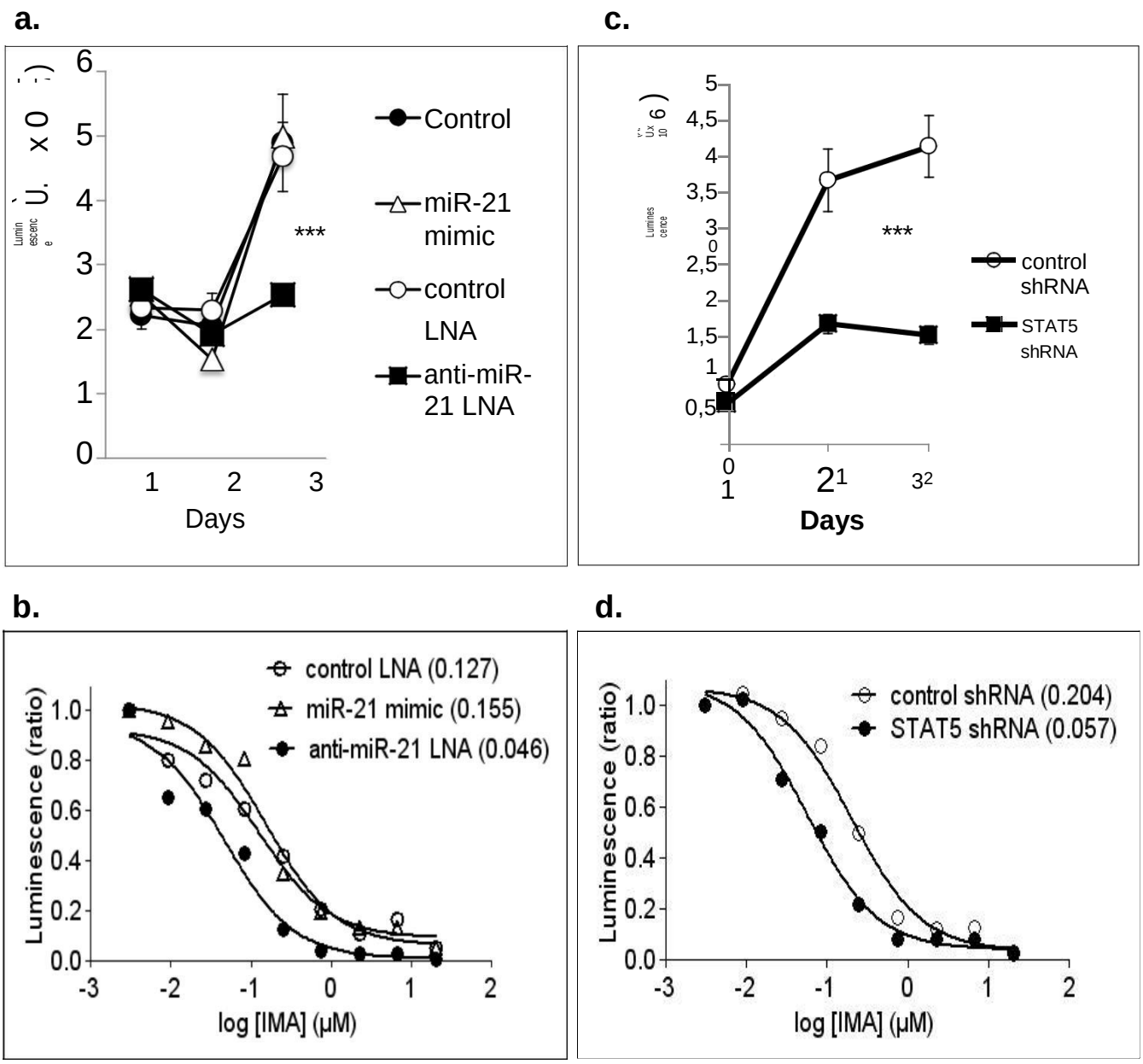


Figure 15. Effet du *knock-down* de miR-21 et de STAT5 sur la prolifération et la sensibilité des cellules K562 à l'imatinib.

La nombre de cellules vivantes de cellule est mesuré indirectement à l'aide du kit CellTiterGlo®

a. et c. Suivi de la prolifération cellulaire sur des K562 *knock-down* pour miR-21 (a) et pour STAT5 (c) (n=3)

b. et d. Courbes dose-effet de l'imatinib sur des K562 *knock-down* pour miR-21 (b) et STAT5 (d). Les IC_{50} (données entre parenthèse) sont déterminés par le logiciel GraphPadPrism. *** : p<0,005

L‘ensemble de ces études suggèrent donc que STAT5 et miR-21 semblent avoir des rôles comparables dans la leucémogenèse. Pour confirmer que miR-21 intervient comme potentiel effecteur de BCR-ABL1/STAT5, nous avons comparés les effets du knock-down (KD) de STAT5 et de l‘inactivation transitoire de miR-21 à l‘aide d‘un oligonucléotide antisens (LNA). Nos résultats présentés dans la figure 15 suggèrent que le KD-STAT5 et le LNA-miR-21 conduisent de façon similaire à un ralentissement de la prolifération cellulaire (figure 15.a et c.) ainsi qu‘à une sensibilisation des cellules à l‘imatinib, avec des décalages des IC_{50} comparables (figure 15 b. et d.). Nous poursuivons actuellement ces expériences avec la confirmation de ces données sur des lignées K562 inactivées pour le gène miR-21 par la technologie CRISPR décrite dans l‘article. Afin de montrer clairement le rôle effecteur de miR-21, nous prévoyons de surexprimer miR-21 dans les lignées KD-STAT5 afin de vérifier que sa seule présence suffit à restaurer le phénotype initial des cellules Ph^+.

c. *Identification de PDCD4 comme cible de miR-21 dans la LMC*

Notre analyse protéomique a montré que le traitement imatinib des cellules K562 induisait des modifications d‘expression de protéines (Article : figure 4.a). Parmi ces protéines, la surexpression la plus franche concerne le facteur pro-apoptotique PDCD4, dont le messager est relativement bien caractérisé pour être une cible de miR-21. Peu de données sont actuellement disponibles sur le rôle précis de PDCD4, mais il semble interagir avec des facteurs impliqués dans la régulation de l‘initiation de la traduction comme eIF4A et eIF4G afin d‘inhiber la traduction des protéines[88]. Son expression est largement rapportée pour être augmentée durant l‘apoptose et diminuée au court de la carcinogenèse dans plusieurs modèles[88].

De précédents travaux ont montré que la régulation de PDCD4 par miR-21 joue un rôle important dans la survie cellulaire dans les modèles de cancers colorectaux, utérins et les glioblastomes[247,275–277]. Pour confirmer le lien de régulation miR-21/PDCD4 dans les K562, nous avons utilisé une construction dans laquelle la séquence 3‘UTR de l'ARNm de PDCD4 est placée en aval de la séquence codante de la luciférase. Dans une construction contrôle, le site de liaison potentiel de miR-21 sur le 3'UTR de PDCD4 a été délété. Les résultats obtenus sur des lignées K562

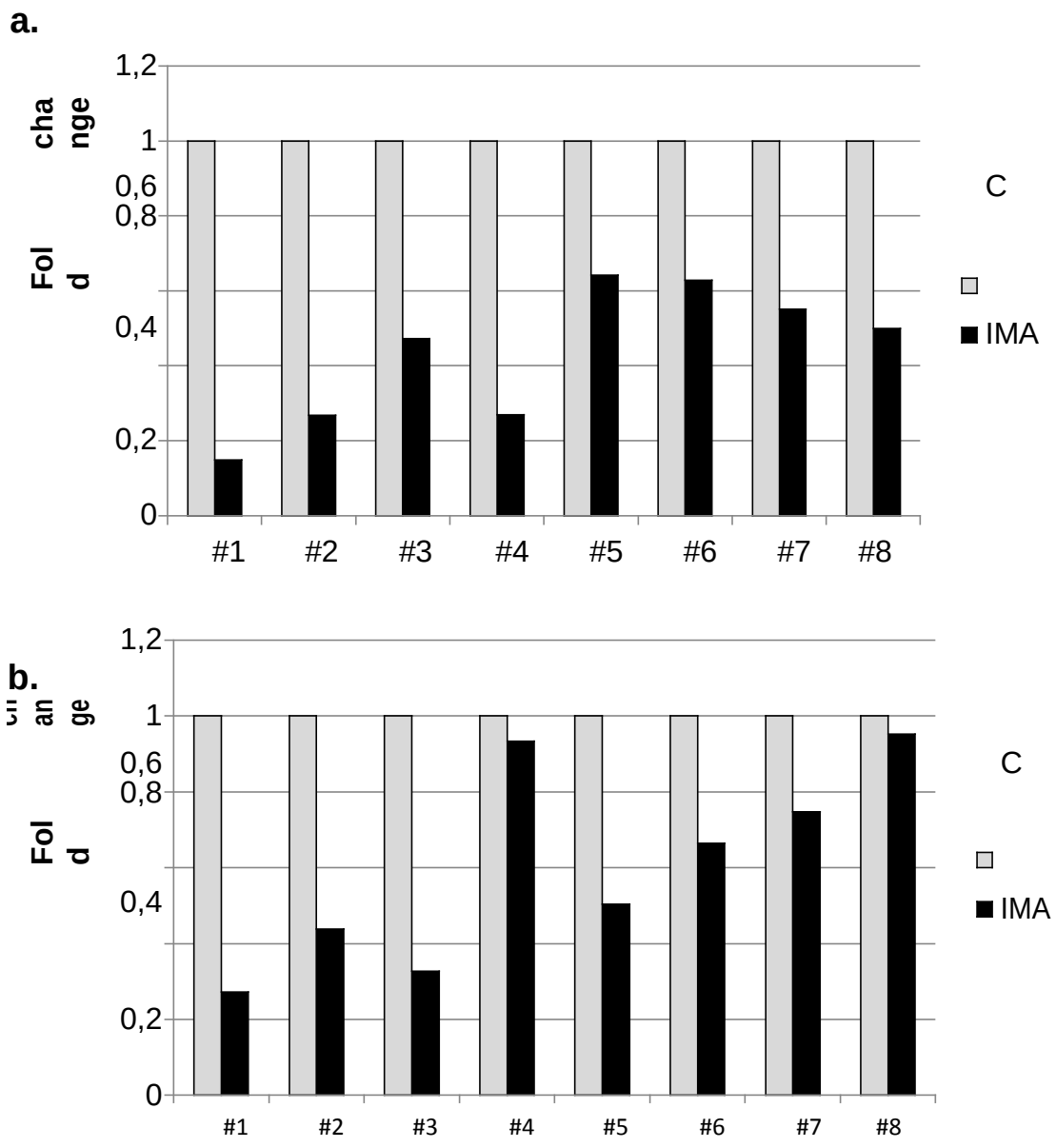


Figure 16. Effet du traitement par l'imatinib sur l'expression de miR-21 et miR-21* dans la lignée K562

La quantification de l'expression des microARN est effectuée par miRT-qPCR.

a. Effet du traitement imatinib 24h, 1µM sur l'expression de miR-21 (n=8 expériences indépendantes)
b. Effet du traitement imatinib 24h, 1µM sur l'expression de miR-21* (n=8 expériences indépendantes)

C = Contrôle. IMA = traitement imatinib.

transfectées et traitées à l'imatinib ou dont l'expression de miR-21 a été artificiellement modulée (LNA ou mimic-miR-21) sont présentés dans l'article en figure 4.c. Ils suggèrent que la présence du site de fixation de miR-21 est bien indispensable à la régulation de la construction rapportrice, ce qui confirme les données de la littérature actuelle[204,251,252]. Les effets de la régulation post-transcriptionnelle de PDCD4 par miR-21 sont confirmés par westernblot (article : figure 4.b). L'absence d'effet de la condition de surexpression de miR-21 observées sur la construction rapportrice est également confirmée par westernblot. Le mimic-miR-21 ayant été testé et validé avant nos expériences, nous supposons que ces résultats s'expliquent par le fait que les K562 présentent déjà un niveau d'expression saturant de miR-21.

3. Etudes complémentaires et perspectives

a. *La régulation de la forme minoritaire miR-21**

Les résultats obtenus par *microarray* montrent une régulation de miR-21 à la fois sous sa forme majoritaire (miR-21) et minoritaire (miR-21*) (article : figure 1.c). L'éditeur nous a suggéré de confirmer que cette forme habituellement minoritaire de miR-21 est effectivement régulée par l'imatinib, et de vérifier sa fonctionnalité dans notre modèle. En effet, jusqu'à aujourd'hui les formes miR* étaient décrites pour être rapidement dégradées et non-fonctionnelles. Cependant, de récentes études ont notamment montré que le miR-21* joue un rôle fonctionnel dans les modèle de cancer de l'ovaire ou de cancer du pancréas[31,278]. Nous avons donc dans un premier temps confirmé par miRT-qPCR que le traitement à l'imatinib induit bien une diminution de miR-21* (figure 16.b) de la même façon que miR-21 (figure 16.a) dans les K562 traitées. En revanche, nous n'avons pas poursuivi dans la recherche des fonctions associées à miR-21* puisque nos données de *microarray* montrent que l'abondance de miR-21* est négligeable (environ 1/100) par rapport à celle de miR-21. D'autre part, ces résultats sont confirmés par notre collaboration avec Laure-Emmanuelle Zaragosi de l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire de Nice-Sophia-Antipolis qui montre sur des données de séquençage nouvelle génération de K562 que miR-21 est représenté par 46772 *reads* par millions de reads, , contre seulement 125 reads par millions pour la forme miR-21*. L'ensemble de ces données montrent donc que la

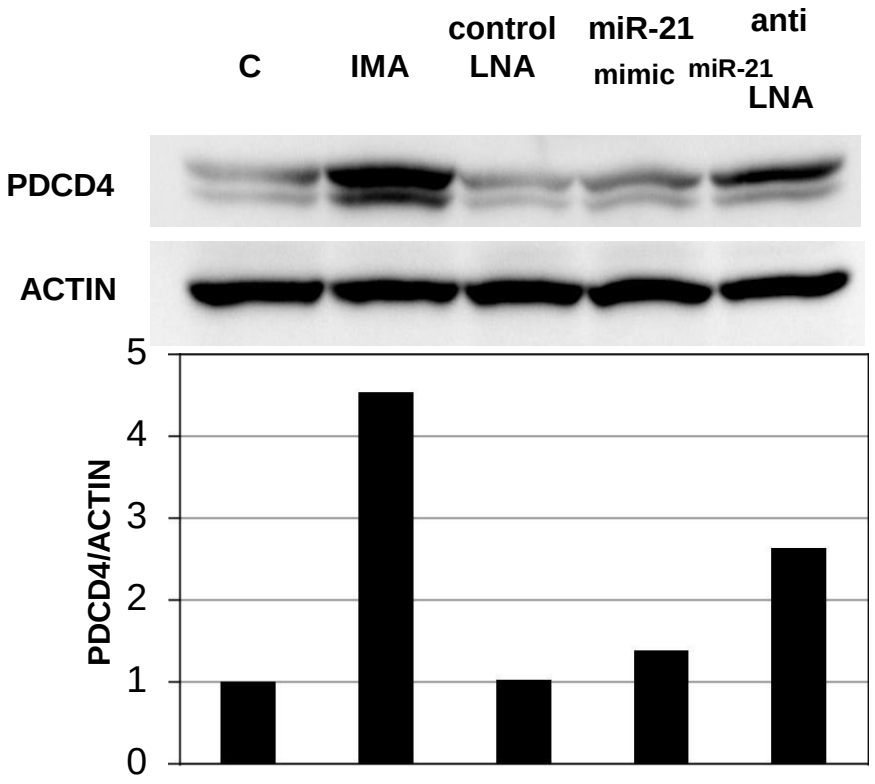


Figure 17. Effet du traitement par l'imatinib et du *knock-down* de miR-21 sur l'expression de PDCD4 comparé au *knock-down* de miR-21

Analyse par *westernblot* et quantification relative de l'expression de PDCD4 dans des cellules K562 traitées 24h avec 1uM d'imatinib, ou transfectées avec le LNA-contrôle, le mimic-miR-21 ou le LNA-anti-miR-21.

.

forme miR-21* reste largement minoritaire dans les cellules K562, et qu'il est peu probable qu'elle joue un rôle fonctionnel significatif par rapport à la forme majoritaire miR-21.

b. *Une double régulation de PDCD4*

Les résultats de notre étude ont confirmé la régulation négative de PDCD4 par miR-21. Cependant, le westernblot présenté dans la figure 17 montre que le traitement imatinib induit une augmentation de l'expression de PDCD4 plus importante que le KD transitoire de miR-21 (LNA-miR-21), suggérant que miR-21 n'est pas le seul responsable de la régulation de PDCD4 par l'imatinib. Nous avons donc cherché à mieux caractériser les modalités de cette régulation régulation. Nos résultats de miRT-qPCR effectuées sur des échantillons de K562 (non montrés ici) suggèrent que le traitement à l'imatinib induit une augmentation de la quantité de transcrits de PDCD4, suggérant une régulation transcriptionnelle dépendante de l'activité de BCR-ABL. Nous avons donc cloné un fragment de la séquence promotrice de PDCD4 en amont d'un gène rapporteur codant pour la luciférase. Nous avons ainsi observé dans des K562 que le traitement imatinib conduit à une augmentation de l'activité du promoteur (non montré ici), confirmant la régulation transcriptionnelle potentielle de PDCD4. Nous avons décidé de ne pas poursuivre dans la recherche de l'intermédiaire de régulation entre PDCD4 et BCR-ABL1 (bien que des résultats non présentés ici suggèrent que ce n'est pas STAT5). Cependant, il serait intéressant de compléter cette étude avec une analyse similaire à celle que nous avons effectuée pour identifier l'intermédiaire de régulation entre BCR-ABL1 et miR-21.

Pour conclure, nos résultats suggèrent que la régulation de l'expression de PDCD4 par l'activité de BCR-ABL1 repose sur deux mécanismes complémentaires: une régulation transcriptionnelle, passant par un ou des facteurs de transcription qui restent à décrire, et une régulation post-transcriptionnelle exercée par miR-21.

c. *Modèles d'études complémentaires : les autres lignées*

Dans notre article, nos résultats décrivent les modalités de régulations de miR-21 dans la lignée modèle K562. Or, ce modèle de lignée n'est pas un modèle parfait puisqu'il correspond à des cellules Ph^+ en phase blastique. Nous avons donc complété

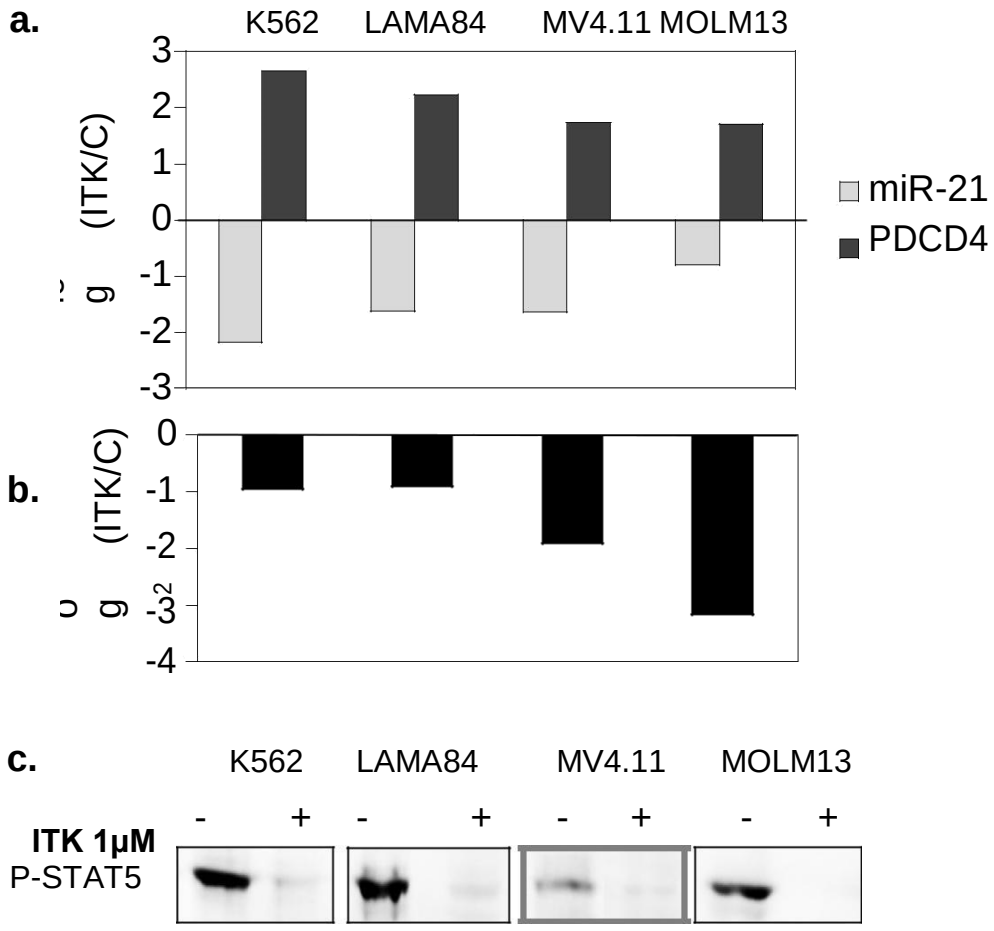


Figure 18. Régulation de l'expression de miR-21, de PDCD4, de l'activité du promoteur de miR-21 et de la phosphorylation de STAT5 par un ITK dans deux lignées de LMC et deux lignées de LAM

A. L'expression de miR-21 et de PDCD4 est quantifiée par miRT-qPCR sur quatre lignées cellulaires traitées ou non avec 1uM d'ITK (imatinib pour les lignées K562 et LAMA84 ; sunitinib pour les MV4.11 et MOLM13)
B. Effet du traitement ITK (1uM, 24h) sur l'activité du promoteur miR-21.
C. Effet du traitement ITK (1uM, 24h) sur la phosphorylation du facteur STAT5 déterminée par *westernblot.*

.

notre étude en confirmant les modalités de régulation de miR-21 et de PDCD4 dans un autre modèle cellulaire Ph^+, la lignée LAMA-84. Nous avons alors montré que le traitement par l'imatinib conduit à une diminution de l'expression de miR-21, corrélée à une déphosphorylation de STAT5 et une augmentation de l'expression de PDCD4 (figure 18) dans les LAMA-84, de façon similaire à ce qui est observé sur les cellules K562. Ces résultats suggèrent donc que l'axe de régulation STAT5-miR-21-PDCD4 est également effectif dans cette lignée. L'idéal aurait été de pouvoir reproduire l'ensemble des études effectuées sur les K562 dans ce modèle ainsi que sur les lignées LAM. Cependant, la difficulté à transfecter et à transduire ces cellules a constitué une limite technique de ce projet.

d. *La limite de la manipulation des $CD34^+$ de patients LMC*

Nous avons confirmé par miRT-qPCR et par westernblot (article : figure 5) que le traitement imatinib des $CD34^+$ de patients LMC induit une diminution de l'expression de miR-21 et une augmentation de l'expression de PDCD4, ainsi qu'une déphosphorylation du facteur STAT5. Nous avons également confirmé sur des $CD34^+$ transfectées avec la construction promoteur miR-21 luciférase que l'imatinib induit une diminution de l'activité du promoteur de miR-21 (article : figure 5.b). L'idéal aurait été de confirmer les expériences de mutagenèse dirigée du promoteur ainsi que l'analyse par gène rapporteur de la régulation du 3'UTR du messager de PDCD4 dans ces cellules. Cependant, la difficulté à transfecter et à transduire ces cellules en raison de leur faible activité de division a constitué une limite dans la démonstration complète de notre étude sur ce modèle.

Enfin, compte tenu des limites techniques énoncées ci-dessus, nous n'avons pas pu compléter cette étude avec l'analyse des fonctions de STAT5 et de miR-21. Cependant, le développement de la technologie CRIPSR dans notre laboratoire permettrait tout de même à l'avenir de sélectionner le faible nombre de cellules inactivées pour les gènes de miR-21 et de STAT5. La mise en culture à long terme de ces cellules délétées permettrait une analyse plus complète des rôles des activités de miR-21 et de STAT5 dans l'oncogénèse induite par BCR-ABL1.

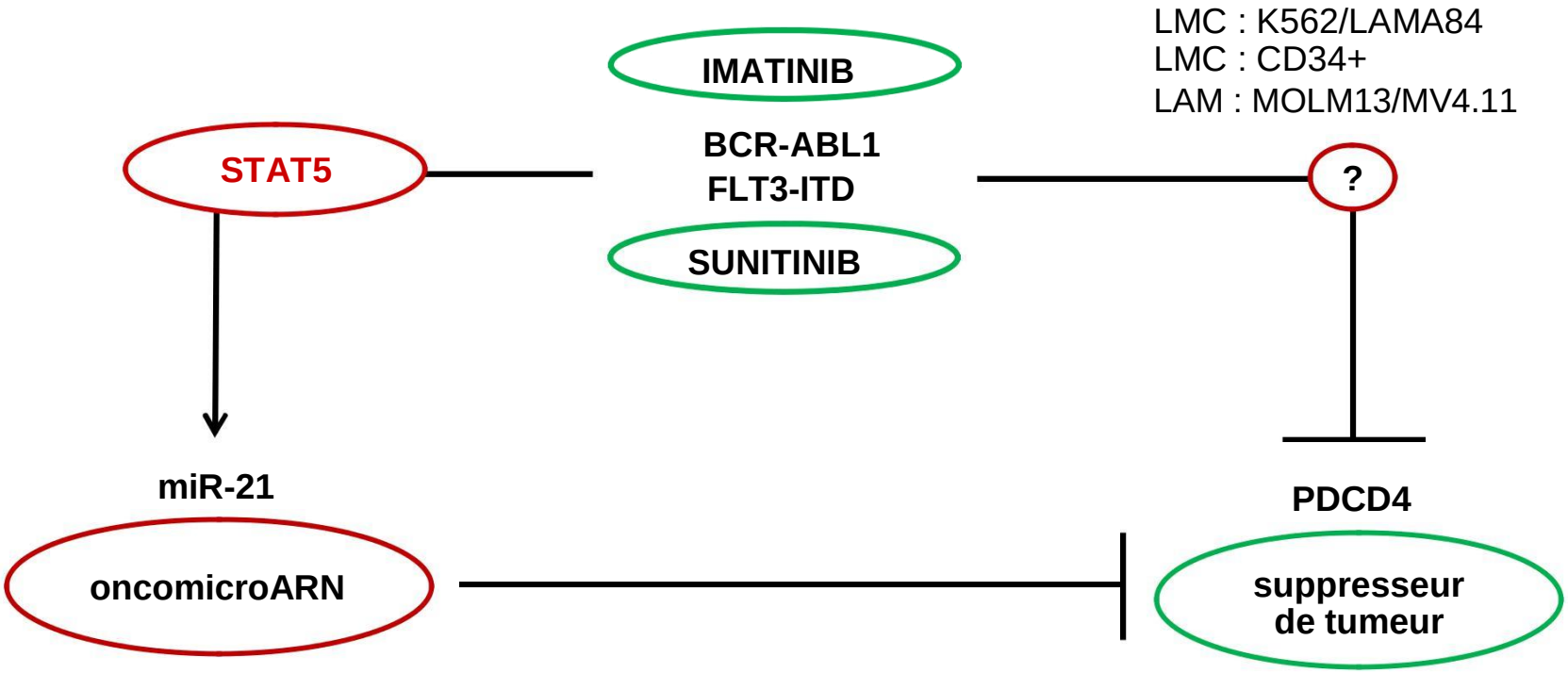


Figure 19 : Schéma général du mécanisme de régulation entre BCR-ABL1 ou FLT3-ITD, miR-21 et PDCD4 proposé par notre étude.

Les résultats suggèrent que BCR-ABL1 régule l'expression de l'oncomicroARN miR-21 et du facteur pro-apoptotique PDCD4. BCR-ABL1 active l'expression de miR-21 par l'intermédiaire du facteur de transcription STAT5. miR-21 réprime l'expression de PDCD4. Indépendemment de l'effet de miR-21, l'expression de PDCD4 est également régulée sur le plan transcriptionnel par un ou des facteurs de transcription non identifiés dans notre étude. Les résultats suggèrent que cette voie de régulation est effective dans deux lignées cellulaires de leucémies aiguës myéloblastyiques (LAM), où l'activation de STAT5 est assurée par l'activité de la tyrosine kinase FLT3-ITD.

4. Synthèse

L'ensemble des données obtenues dans cette étude permet de mettre en évidence un axe de régulation BCR-ABL1/STAT5/miR-21/PDCD4 dans le modèle de la LMC, mais aussi probablement dans le modèle de LAM FLT3-ITD (figure 19).

En effet, nous avons montré dans deux lignées modèles de cellules Ph^+, des cellules primaires de patients LMC ($CD34^+$) et sur deux lignées modèles $FLT3\text{-}ITD^+$ que STAT5 est un facteur intermédiaire indispensable à la régulation de l'oncomicroARN miR-21. Nos expériences en cours tendent également à suggérer un rôle fonctionnel redondant de miR-21 et de STAT5 dans le phénotype oncogénique des cellules Ph^+. Enfin, nous avons également montré que PDCD4 est une cible de miR-21 dans la LMC, mais que cette régulation intervient en complément d'une régulation transcriptionnelle par un facteur de transcription non déterminé (corrélation également observée dans les lignées LAM). Pour conclure, nous pouvons alors nous demander si ce mécanisme de régulation n'est pas effectif dans l'ensemble des modèles de cancers présentant une surexpression de STAT5 ou une mutation ayant pour effet de phosphoryler de façon constitutive STAT5. En effet, la surexpression de miR-21 a par exemple été rapporté dans des modèles de cancers du pancréas et de la prostate, également connus pour présenter une phosphorylation accrue du facteur $STAT5^{279–281}$. Des analyses complémentaires dans ces modèles pourraient être intéressantes dans la généralisation de cet axe de régulation et pourrait supporter le lien entre ces deux oncogènes STAT5 et miR-21, largement étudiés dans plusieurs modèles de cancers.

PROJET 2

Identification d‘un profil microARN spécifique des cellules souches LMC

I. OBJECTIFS

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un modèle d'étude de la cellule souche cancéreuse puisqu'elle se caractérise par l'apparition de l'oncoprotéine BCR-ABL1 dans la cellule souche hématopoiétique (CSH). Le développement de thérapies ciblées telles que l'imatinib a permis de réguler la prolifération des cellules différenciées Ph^+ répondant par une apoptose au traitement. Cette réponse montre la dépendance de ces cellules à l'activité de BCR-ABL1. Cependant, plusieurs études montrent la persistance des CSH-LMC suite aux traitements ITK[170,282]. En effet, l'étude de Corbin et al. suggère une persistance des CSH-LMC plutôt qu'une résistance de celles-ci compte tenu du fait que le traitement ITK de ces cellules conduit bien à l'inhibition de l'activité de BCR-ABL1 et à la déphosphorylation de ses cibles[218]. Ces cellules ne répondent cependant pas par une apoptose contrairement aux cellules plus différenciées, suggérant une indépendance de celles-ci à l'activité de BCR-ABL1. Cette persistance des CSH-LMC pose le problème de la curabilité de la LMC, régulièrement discuté[220,283]. Une meilleure caractérisation de ces cellules présente donc un enjeu dans l'amélioration de la prise en charge à long terme de la maladie et des patients.

Les avancées technologiques en transcriptomique et de cytométrie de flux ont permis d'isoler des populations de plus en plus enrichies en cellules souches, triées en fonction de leur marquages de surface $CD34^+CD38^{low}CD45RA^+CD133^-$. Les études des équipes de Gerber et al. et Valent et al. ont notamment permis de mettre en évidence quelques marqueurs de surface spécifiques et fonctionnels des CSH-LMC[197,199]. Notre projet s'est donc proposé de compléter ces données transcriptomiques par la description du répertoire microARN propres aux CSH-LMC étant donné qu'il n'a jamais été publié jusqu'à maintenant. En effet, les quelques études de répertoire microARN dans le contexte de la LMC se basent généralement sur l'analyse d'échantillons de sang périphérique ou du compartiment cellulaire $CD34^+$[108,202]. Pour rappel, ces analyses ont notamment permis de mettre en évidence la régulation de l'expression de plusieurs microARN (miR-17-92, miR-10a, miR-150 et miR-155), liée pour certaine à l'activité de BCR-ABL1 (miR-150 et miR-155). Cependant, ces travaux portent sur des populations cellulaires encore très hétérogènes et nécessitent d'être confirmés dans des populations plus enrichies en CSH-LMC.

L‘objectif de notre étude a donc été d‘identifier des microARN spécifiques aux populations enrichies en CSH-LMC. La finalité de ce projet est d‘identifier à terme des microARN impliqués dans la persistance des CSH-LMC suite aux traitements ITK.

Dans un souci de clarté, les populations cellulaires étudiées caractérisées par le marquage de surface $CD34^{+}CD38^{low}$ seront appelées CSPH (cellules souches et progéniteurs hématopoiétiques) tandis que les populations $CD34^{+}CD38^{+}$ constituent les progéniteurs/précurseurs plus différenciés. Ces appellations permettent de rappeler que nos populations d‘intérêt ne sont pas encore pures en cellules souches mais présentent un enrichissement plus important que dans le cas d‘étude des populations $CD34^{+}$.

II. Matériels et méthodes

1. Méta-analyse de données de transcriptomes de cellules $CD34^+CD38^{low}$ et $CD34^+CD38^+$

Les jeux de données de transcriptomes des populations $CD34^+CD38^{low}$ et $CD34^+CD38^+$ de moelles osseuses de patients LMC obtenues par les équipes de Gerber[199] et de Valent[197] ont été récupérés sur le *Gene Expression Omnibus* (GEO) du NCBI, où elles sont mises à disposition de la communauté scientifique. Il s'agit dans les deux cas de données obtenues sur des *microarrays* Affymetrix. Nous avons utilisé les données brutes afin d'appliquer aux deux jeux de données les mêmes protocoles de transformation logarithmique, de normalisation (méthode du Target-percentile: attribution de la valeur 500 au gène classé au 75ème percentile) et de recherche des gènes différentiellement exprimés entre les deux sous-populations (*two samples t-test*). Les gènes différentiellement exprimés dans les deux études ($p<0.001$) ont été comparés avec l'*add-in* Excel *Merge Table Wizard* (AbleBits).

2. Sources cellulaires

Les cellules leucémiques ont été obtenues à partir d'échantillons de cytaphérèses ou de ponctions sur moelles osseuses sur patients LMC au diagnostic. Les cytaphérèses se définissent par une technique de prélèvement sanguin par aphérèse, c'est-à-dire qu'au cours du prélèvement, les échantillons ont été centrifugés afin de séparer les populations de cellules mononuclées d'intérêt, et les autres cellules (globules rouges, plaquettes etc…) réinjectées directement au patient. Ces échantillons enrichis en cellules mononuclées présentent également un enrichissement en CSH, justifiant leur utilisation massive dans les années 90 avant l'apparition des ITK dans le traitement des patients LMC par autogreffes. Leur avantage principal réside dans le fait que ces échantillons procurent une grande quantité de cellules de départ. Cependant, le fait que ces échantillons soient anciens et conservés congelés depuis parfois plusieurs dizaines d'années peut constituer une limite en terme de viabilité des cellules.

Les prélèvements de moelles osseuses de patients LMC nous ont été fournis par le Dr. Gabriel Etienne de l'institut Bergonié. Ces prélèvements se présentent sous

la forme d'échantillons d'environ 1mL ponctionnés au niveau de la crête iliaque ou du sternum. Ces prélèvements restent rares puisqu'ils ne sont opérés qu'en cas de suspicion de LMC afin d'en confirmer le diagnostic et déterminer le stade d'évolution de la maladie.

Les sangs de cordon utilisés comme contrôles des préparations de LMC sont obtenus à partir de prélèvements effectués à la maison de santé protestante de Bagatelle (Talence). L'avantage de cette source de cellules est la grande concentration de CSH que l'on peut trouver par échantillon. Cependant, bien que qu'un prélèvement de sang de cordon procure un échantillon sanguin d'environ 20mL, la quantité finale de CSH reste relativement faible. D'autre part, ces échantillons restent fragiles et sont inexploitables dans environ 30% des cas en raison de fréquentes réactions d'hémolyse.

3. Préparation des cellules mononuclées

Les cellules mononuclées issus des prélèvements sanguins de sangs de cordon, de moelles osseuses ou de cytaphérèses sont séparées en fonction du gradient de densité instauré par du ficoll. Le mélange cellules-ficoll est centrifugé 20min à 1000rpm sans frein. La phase supérieure transparente regroupe les cellules les plus légères comme les plaquettes et le sérum. La phase inférieure rouge comporte l'ensemble des débris cellulaires et les globules rouges plus denses. La phase centrale se présente sous forme d'un anneau opaque dans lequel sont concentrées les cellules mononuclées. Après récupération de l'anneau, les cellules sont lavées deux fois dans 30mL de PEB (PBS-EDTA[2mM]-BSA[0,5%]). Avant la dernière centrifugation, les cellules sont comptabilisées afin de préparer l'étape de purification des cellules immatures en fonction de leur marquage cellulaire CD34. Au cours de chaque étape, du pulmozyme est additionné à hauteur de 25% afin de prévenir une éventuelle coagulation des échantillons.

4. Tri des populations $CD34^{+}CD38^{+/low}$

Suite à la prépapration des cellules mononuclées, les cellules $CD34^{+}$ sont sélectionnées par une méthode d'immunomarquage magnétique dans les conditions du kit StemSep® (StemCell technologies) pour les échantillons LMC, et du kit EasySep® (StemCell technologies) pour les sangs de cordons. La sélection magnétique s'opère

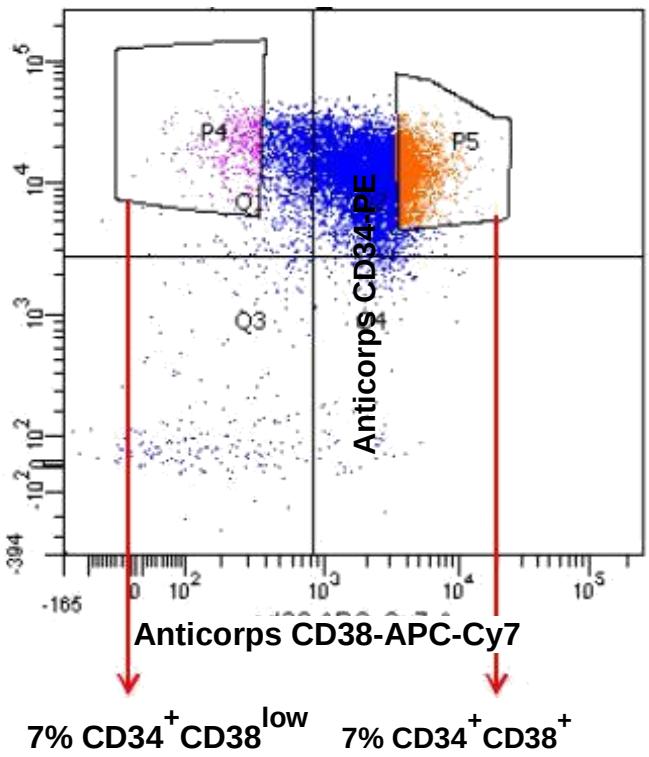


Figure 20. Tri par cytométrie de flux des populations $CD34^{+}CD38^{low}$ et $CD34^{+}CD38^{+}$ de LMC

Exemple d'un double marquage CD34/CD38 sur des cellules $CD34^{+}$ obtenues à partir d'une cytaphérèse d'un patient LMC . P4 et P5: sélection des cellules ayant une expression de CD38 comprise entre le 1^{er} et le $7^{ième}$ centile (7% $CD34^{+}CD38^{low}$) et de celles ayant une expression de CD38 comprise entre le $93^{ième}$ et le $100^{ième}$ centile (7% $CD34^{+}CD38^{+}$)

.

ensuite par chargement des échantillons LMC sur colonnes MS (Miltenyi) préalablement installées dans le dispositif magnétique VarioMACS (Miltenyi), tandis que les cellules $CD34^+$ de sang de cordons sont isolées à partir du dispositif magnétique EasySep®. Les cellules sont ensuite mises en culture dans un milieu STEMalphaA à raison de 1.10^6 cellules par mL à 37°C, 5%CO_2 jusqu'au tri cellulaire effectué le lendemain.

Le second tri, $CD34^+/CD38^{+/low}$, s'effectue le lendemain par immunomarquage à l'aide d'anticorps spécifiques des protéines de surface couplés à des fluorochromes et détectés par cytométrie de flux. Les cellules sélectionnées $CD34^+$ sont concentrées à raison de 1.10^6 de cellules par 100µL de PEB pour procéder au double marquage CD34-CD38. Les anticorps anti-CD38 humain, associé au marqueur fluorescent APC-Cy7 (clone HIT2-Biolegend), et anti-CD34 humain, associé au PE (clone 581-Biolegend), sont ajoutés pour une quantité finale de 125ng. Des tubes de marquage non-spécifique contrôles sont également préparés à l'aide des anticorps isotypes murins IgG1 (clone MOPC-21) propre à chaque marqueur fluorescent. Les cellules sont laissées en contact avec les anticorps 20 min à 37°C, 5%CO_2 puis rincées en PEB avant d'être resuspendue à raison de 20^6 cellules par mL en PEB. L'étude de Gerber et al. montre que la population $CD34^+CD38^{low}$ constitue environ 10% des $CD34^+$ totales[284]. Ces paramètres sont donc appliqués de façon plus stringeante: parmi les cellules $CD34^+$, les 7% des cellules présentant le plus faible marquage CD38 sont triées (figure 20). Ce seuil est également appliqué à la fraction $CD34^+CD38^+$, correspondant aux 7% des cellules $CD34^+$ ayant le plus fort marquage CD38. Ce tri est opéré à la plateforme de cytométrie de la SFR Transbiomed, par Santiago Gonzalez et Vincent Pitard sur un trieur FACS Aria (BD biosciences). En raison du faible nombre de cellules récupérées au terme des 2 sélections effectuées,, et pour limiter des stress cellulaires additionnels, les cellules triés sont directement récupérés dans 250µL de Qiazol (Qiagen), un tampon de lyse cellulaire spécifiquement adapté à la préparation des ARN des échantillons faiblement concentrés en cellules.

5. Extraction des ARN

Le kit d'extraction ARN utilisé dépend du nombre de cellules obtenues suite au tri cellulaire. Les ARN des échantillons cellulaires de cytaphérèses (entre 100 000 et 500 000 cellules) ont été extraits dans le respect des conditions du kit *RNeasy mini* de

Qiagen®. Les ARN finaux sont élués dans 30µL d'H_20 et traités à la DNase dans les conditions préconisées par Sigma®. Leur concentration est quantifiable par analyse au Nanodrop.

Les ARN des échantillons de moelles osseuses et de sangs de cordon, moins riche (5000 à 10 000 cellules), ont été extraits dans les conditions du kit *miRNeasy microkit* de Qiagen®. Les ARN finaux sont élués dans 14µL d'H_20. En raison de la faible concentration cellulaire de départ, la quantité d'ARN finale obtenue n'est pas quantifiable par spectrophotométrie.

6. Analyse *microarray*

Les ARN ont étés marqués et hybridés sur des *microarray* en suivant le même protocole que pour l'étude présentée dans l'article. En bref, le kit *miRNA complete labeling kit version 2.2* (Agilent Technologies) a été utilisé selon les recommandations du fournisseur. Le principe est la ligation à l'extrémité 5' des microARN (mais aussi de tous les ARN de la préparation possédant une extrémité 5' phosphate) d'une molécule de cytidine marquée par un fluorophore (le Cy3), sous l'action d'une ARN ligase. Les Cy3-C non incorporés sont simplement éliminés par chromatographie d'exclusion sur colonnes de polyacrylamide (BioGel P10, BioRad). Après séchage au *speedvac*, les ARN marqués ont étés mélangés au tampon d'hybridation du fournisseur, et appliqués sur des lames *Human miRNA Microarray V2* (Agilent Technologies) qui ont ensuite été placées pour 16 heures dans un four à hybidation (à 55°C). Après lavages utilisant les tampons du fournisseur, les lames ont été scannées sur un scanner G2565CA (Agilent Technologies), à la résolution de 5 µm et en utilisant le mode de scan 20-bit. L'extraction des signaux à partir des images a été réalisée par le logiciel Feature Extraction V10.7 (Agilent Technologies).

La suite logicielle BRB array tools (Simon et al., 2007) est utilisée pour l'ensemble des traitements des résultats: définition du seuil d'intensité minimum; normalisation (méthode des quantiles); classification des échantillons (clustering hiérarchique); recherche des gènes différentiellement exprimés (T-test pour échantillons appariés, seuil de significativité: 0.05)

7. Quantification de l'expression des microARN et des ARNm par RT-PCR quantitative

L'étape de quantification par RT-PCR des microARN et des transcrits d'intérêt sont effectuées dans les mêmes conditions que dans l'article présenté précédemment. Les amorces utilisées sont détaillées dans le tableau 6. Les résultats obtenus pour les microARN d'intérêts sont normalisés en utilisant la moyenne du niveau d'expression des microARN miR-19b, miR-20a, miR-21, miR-23, miR-27a, let-7c et U6. En effet, nos résultats *microarray* suggèrent que leur expression est la même entre les fractions CSPH et les progéniteurs/précurseurs et qu'ils constituent un meilleur contrôle que le seul ARN U6 classiquement utilisé mais qui n'est pas un microARN. La normalisation des résultats obtenus pour les transcrits GAS2, CRHBP, HLF, IL1R1, RNASE2, CLC, HDC est effectués en fonction de l'expression de la GAPDH.

L'expression des microARN et des transcrits d'intérêt utilise le calcul 2^{-ddCt}. Elle est exprimée en *fold change* par rapport à une échantillon arbitrairement considéré comme contrôle.

8. Analyse statistique

Les résultats de miRT-qPCR et de RT-qPCR sont analysés à l'aide du logiciel GraphPadPrism. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type de la moyenne (SEM: *standard error at the mean*) entre les valeurs de chaque condition. La significativité des différences est évaluée en fonction du test Mann-Whitney.

III. Résultats

1. Contrôle qualité des échantillons $CD34^+CD38^{low}$ purifiés

Comme indiqué plus haut, l'obtention de cellules $CD34^+CD38^{low}$ et $CD34^+CD38^+$ nécessite plusieurs étapes successives : préparation de cellules mononuclées, séparation de la fraction $CD34^+$, marquage par des anticorps fluorescents, tri cellulaire et extraction des ARN. Avant d'étudier le profil d'expression des microARN de nos préparations ($CD34^+CD38^{low}$ et $CD34^+CD38^+$ de cytaphérèses de quatre patients LMC), nous avons voulu vérifier qu'elles étaient de qualité comparable à celles utilisées par des équipes ayant récemment étudié et publié les transcriptomes de telles préparations : l'équipe de Peter Valent en Autriche[197] et celle de Yegnasubramanian et al. aux Etats Unis[199] (étude qui sera intitulée *Gerber* dans la suite du manuscrit, du nom de son premier auteur). Nous nous sommes focalisés sur ces deux études car les données brutes de transcriptomes sont accessibles dans la base de données publiques GEO, et parce qu'elles ont utilisés des techniques comparables l'une à l'autre (tableau 7). Dans ces deux études, les auteurs comparent les transcriptomes de cellules $CD34^+CD38^{low}$ et $CD34^+CD38^+$ de moelles osseuses de patients LMC à celles d'individus sains (sangs de cordon) sur des *microarrays* Affymetrix. Si l'étude *Gerber* utilise cinq moelles osseuses différentes et autant de sangs de cordons, ce qui permet de rechercher les gènes dont l'expression distingue les individus sains des malades, l'étude *Valent* n'analyse qu'un sang de cordon à coté de quatre moelles osseuses de LMC. L'échantillon *sang de cordon* étant dans ce cas trop petit, nous nous sommes focalisés uniquement sur les transcriptomes obtenus à partir des sous-populations $CD34^+CD38^{low}$ et $CD34^+CD38^+$ des patients LMC (cinq chez *Gerber*, quatre chez *Valent*).

Les données brutes (non normalisées) des transcriptomes des deux études ont été traitées indépendamment, les *microarrays* utilisés n'étant pas strictement les mêmes. Pour chacune des deux études, l'analyse a consisté à réaliser une normalisation inter-*array* et à une recherche par un t-test pour échantillons appariés (suite logicielle *BRB array tools*) des gènes différentiellement exprimés entre les deux sous-populations $CD34^+CD38^{low}$ et $CD34^+CD38^+$. Malgré l'utilisation d'un seuil de significativité relativement stringent ($p<0.005$) de nombreux gènes distinguent les deux sous-

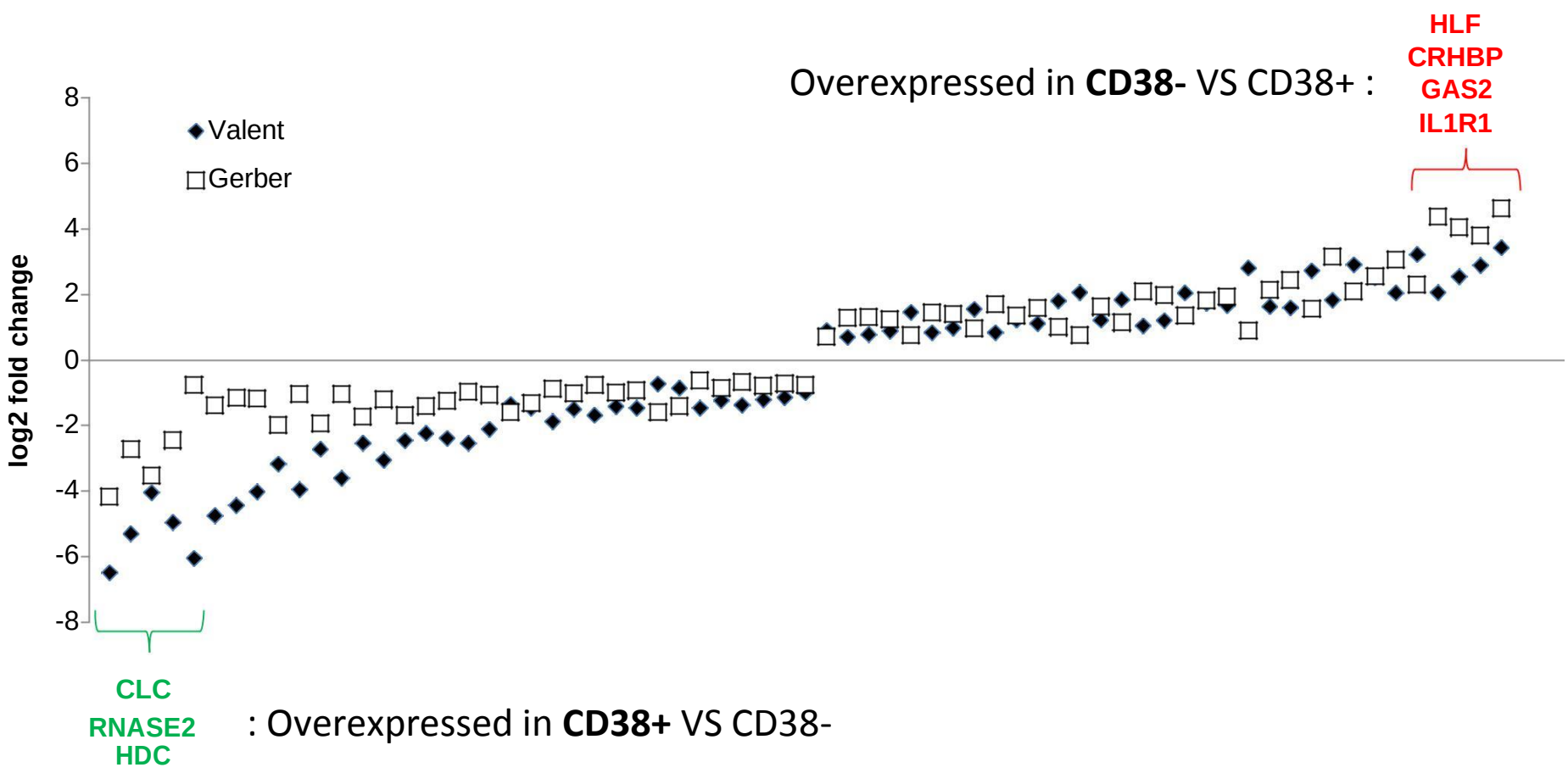


Figure 21 : Résultats de la méta-analyse des études transcriptomiques *Gerber et al.* et *Valent et al.*.

Le graphique présente les logarithmes$_2$ **des rapports d'expression des 67 gènes trouvés comme étant** significativement ($p<0.001$) différentiellement exprimés dans les fractions $CD34^+CD38^{low}$ et $CD34^+CD38^+$ dans les études Gerber et Valent. En vert, les trois gènes les plus sous-exprimés dans la fraction CSPH-LMC et en rouge les quatre gènes les plus surexprimés dans la fraction CSPH-LMC.

populations: 1244 gènes pour *Valent*, et 728 pour *Gerber*. Les résultats sont proches de ceux publiés dans les articles correspondants, ce qui valide nos analyses. Le croisement de ces deux listes montre que 67 gènes leur sont communs, c'est à dire différentiellement exprimés entre les cellules $CD34^{+}CD38^{low}$ et $CD34^{+}CD38^{+}$ à la fois dans l'étude *Gerber* et dans l'étude *Valent*. La figure 21 représente les expressions différentielles (exprimées sous forme de logarithmes) de ces 67 gènes dans les deux études *Gerber* et *Valent* : elle illustre que la liste contient 33 gènes surexprimés dans la fraction CSPH $CD34^{+}CD38^{low}$ (dans la partie droite du graphique) et 34 gènes surexprimés au contraire dans la fraction progéniteurs/précurseurs $CD34^{+}CD38^{+}$ (partie gauche du graphique).

Ces résultats ont servi à définir une courte liste de gènes dont l'expression distingue de manière très significative les deux sous-populations dans les études *Gerber* et *Valent*. Parmi les exemples extrêmes, HLF, GAS2, IL1R1 et CRHBP semblent fortement et significativement surexprimés dans les CSPH tandis que CLC, HDC et RNASE2, semblent fortement et significativement surexprimés dans les progéniteurs/précurseurs. De façon intéressante, les protéines CLC, HDC et RNASE2 sont rapportés comme des marqueurs de la différenciation myéloïde, éosinophile et basophile[285,286], ce qui est en cohérence avec le caractère plus engagé dans la différenciation hématopoïétique des progéniteurs/précurseurs (fraction $CD34^{+}CD38^{+}$) par rapport aux cellules de la fraction $CD34^{+}CD38^{low}$. La protéine HLF, dont le transcrit est le plus significativement enrichi dans la population CSPH, a plusieurs fois été rapporté pour jouer un rôle dans le maintien des propriétés souches des CSH. D'autre part, la surexpression du facteur GAS2 dans les cellules LMC a déjà été décrite dans plusieurs études, en plus de son rôle potentiel dans la régulation de la prolifération cellulaire au cours de la leucémogenèse[287]. Aucune donnée ne permet à ce jour de lier CRHBP et IL1R1 au contexte souche ou leucémique, bien que l'étude récente de Landberg et al. confirme la surexpression de ce dernier dans les cellules immatures de patients LMC[288].

L'expression de ces sept gènes a été mesurée à partir des préparations d'ARN des cellules $CD34^{+}CD38^{low}$ et $CD34^{+}CD38^{+}$ obtenues au laboratoire. La figure 22 synthétise les résultats et elle montre que nos préparations sont, sur le plan transcriptomique, tout à fait comparables à celles utilisées dans les études *Valent* et *Gerber*, ce qui valide nos choix concernant les divers protocoles qui permettent de préparer des ARN à partir sous-populations cellulaires rares.

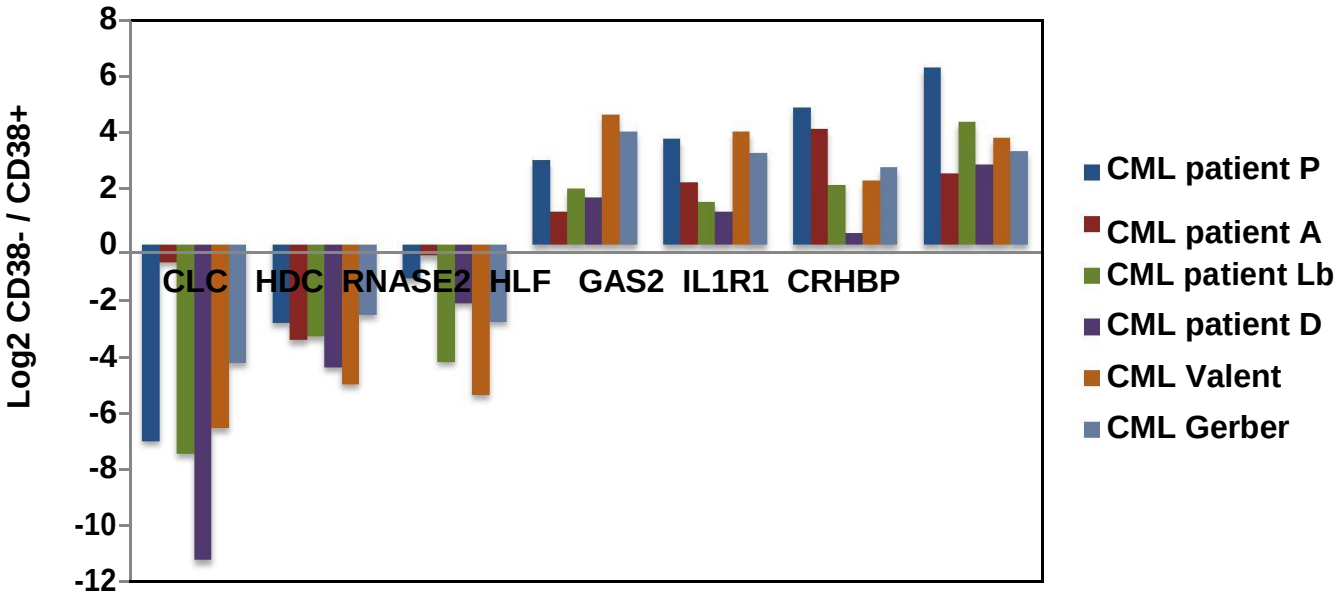


Figure 22. Quantification par RT-qPCR de sept ARNm dans les préparations de cellules $CD34^+CD38^{low}$ et $CD34^+CD38^+$ de quatre patients LMC.

Pour chaque ARNm et pour chaque patient, l'histogramme représente le $logarithme_2$ du rapport (expression dans les cellules $CD34^+CD38^{low}$ / expression dans les cellules $CD34^+CD38^{low}$).

2. Comparaison du profil d'expression des microARN des sous-populations CSPH et progéniteurs/précurseurs de LMC

L'analyse du profil d'expression des microARN des préparations de cellules $CD34^{+}CD38^{low}$ et $CD34^{+}CD38^{+}$ de quatre patients LMC a été effectuée par hybridation des ARN marqués sur des *microarrays* Agilent miRNA V2.0. Les résultats nous ont d'abord permis de classer les échantillons sur la seule base de leur profil microARN. Ils ont ensuite été utilisés pour définir les microARN différentiellement exprimés entre les deux sous-populations. Les expressions différentielles d'une liste restreinte de microARN ont par la suite été confirmées par miRT-qPCR sur différentes cytaphérèses ou moelles osseuses au diganostic.

a. *Un profil et une population différente*

L'analyse des données de la puce microARN par la suite logicielle *BRB array tool* permet dans un premier temps de mettre en évidence que les populations CSPH présentent un profil microARN qui leur est propre, indépendamment du patient dont elles proviennent : le dendogramme de la figure 23 montre que dans le cadre d'une classification (ou *clustering*) hiérarchique des échantillons analysés sur la seule base de leur profil microARN, les quatre préparations de CSPH ($CD34^{+}CD38^{low}$) provenant des quatre patients LMC sont plus proches les unes des autres qu'elles ne le sont des progéniteurs/précurseurs ($CD34^{+}CD38^{+}$). En d'autres termes, les CSPH d'un patient sont moins proches (ou ressemblantes) des progéniteurs/précurseurs du même patient qu'elles ne le sont des CSPH d'un autre patient. Cela est en faveur de l'existence de régulations de l'expression des gènes par les microARN propres aux CSPH, même si cette première approche ne permet pas d'identifier quel(s) microARN pourraient intervenir dans ces régulations CSPH-spécifiques.

b. *Des microARN différentiellement exprimés entre les deux sous-populations*

Les sous-populations CSPH ($CD34^{+}CD38^{low}$) et progéniteurs/précurseurs ($CD34^{+}CD38^{+}$) préparées à partir d'un même patient sont clairement appariées puisqu'elles ont été isolées à partir de la même préparation de $CD34^{+}$. L'utilisation de la fonction *paired t-test* proposée par *BRB array tools* permet de rechercher des

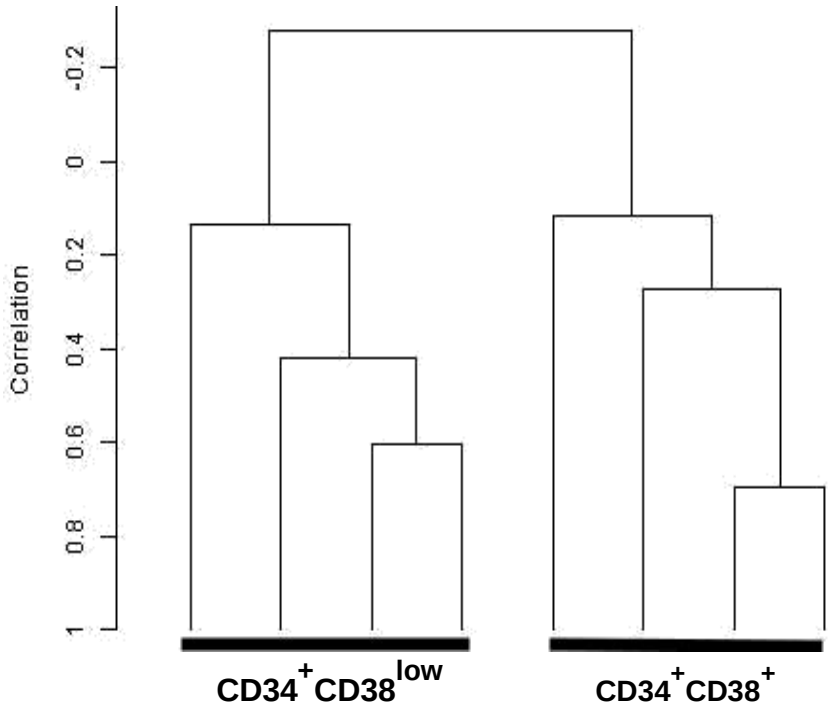


Figure 23. Classification hiérarchique des préparations de cellules $CD34^+$ $CD38^{low}$ et $CD34^+$ $CD38^+$ de quatre patients LMC sur la base de leur profil d'expression des microARN

microARN différentiellement exprimés avec un $p<0.05$, parmi lesquels 17 ont un $p<0.01$. Une analyse utilisant un t-test pour échantillons non appariés (*two-samples t-test*) donne sensiblement les mêmes résultats puisqu'elle propose 33 microARN ayant un $p<0.01$, parmi lesquels se trouvent entre autre les 17 microARN définis par le *paired t-test*. Les valeurs de p calculés par le *two samples t-test* sont plus favorables mais sont surestimées compte tenu de la taille réduite des deux échantillons (n=4).
Plusieurs représentations des résultats sont ainsi possibles:

La *heatmap* présentée figure 24 illustre en fausses couleurs les niveaux d'expression des microARN différentiellement exprimés. Elle contient les 33 gènes identifiés par l'analyse *two-samples t-test*, le *paired t-test* ne donnant pour chaque microARN qu'un rapport d'expression moyen entre les deux échantillons et donc des *heatmaps* moins illustratives. Elle permet de vérifier que pour chaque microARN identifié, les quatre mesures correspondant aux quatre préparations d'ARN de chacun des deux échantillons sont dans la plupart des cas proches.

Le *scatter plot* de la figure 25 représente la moyenne du niveau d'expression de tous les microARN étudiés dans les deux échantillons (802 sont représentés sur le *microarray*). Les points qui sont proches de la bissectrice représentent à des microARN exprimés de façon similaires entre les sous-populations $CD34^{+}CD38^{low}$ (sur l'axe des y) et $CD34^{+}CD38^{+}$ (sur l'axe des x). Au contraire, les points qui s'écartent de la bissectrice sont différentiellement exprimés, sans cependant que cette représentation ne donne d'indication sur la significativité de ces expressions différentielles. Quatre microARN qui ont retenus notre attention et surexprimés dans la fraction $CD34^{+}CD38^{low}$ sont indiqués sur ce graphe : miR-10a, miR-150, et miR-155 et miR-146a.

Le *volcano plot* de la figure 26 permet d'apprécier pour chaque microARN la différence d'expression entre les deux sous-populations (sur l'axe des x) et la significativité associée (axe des y). Il illustre que les microARN miR-10a, miR-150, miR-155 et miR-146a sont significativement et fortement différentiellement exprimés (dans le sens d'une surexpression dans la fraction $CD34^{+}CD38^{low}$).

Une dernière représentation possible est plus simplement la quantification de l'abondance des microARN d'intérêt (exprimée en logarithme de fluorescence normalisée) dans les quatre prélèvements de chacun des deux échantillons. La figure 27, illustre le différentiel d'expression de miR-10a, miR-150, miR-155 et miR-146a. La relative variabilité d'expression de miR-150 dans la fraction CSPH-LMC explique

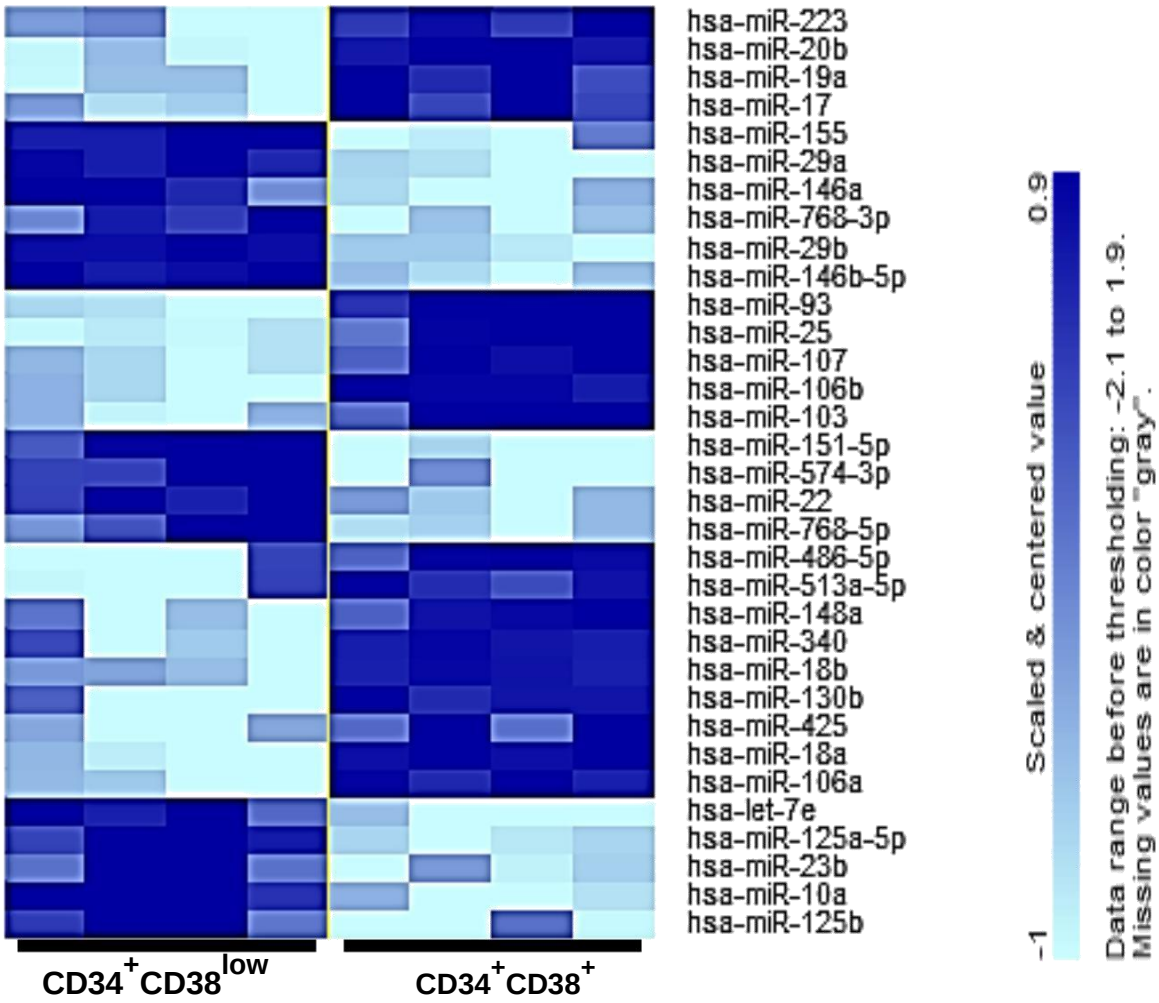


Figure 24. *Heatmap* du profil d'expression des microARN différentiellement exprimés entre les échantillons $CD34^{+}CD38^{low}$ et $CD34^{+}CD38^{+}$

Pour chaque échantillon, les quatre colonnes correspondent à la quantification (normalisée) des microARN d'un patient

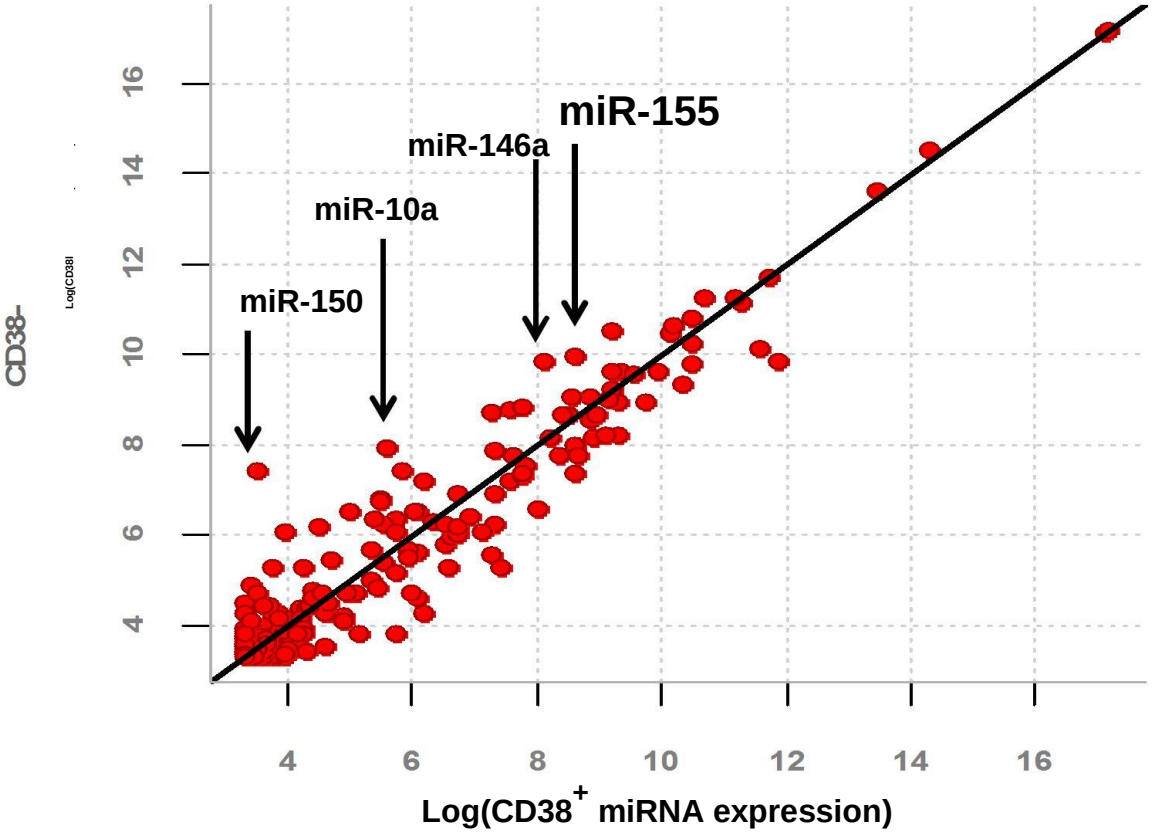


Figure 25. Scatter plot de l'expression des microARN dans les deux échantillons $CD34^+CD38^{low}$ et $CD34^+CD38^+$

Chaque point représente l'expression normalisée et moyennée d'un microARN

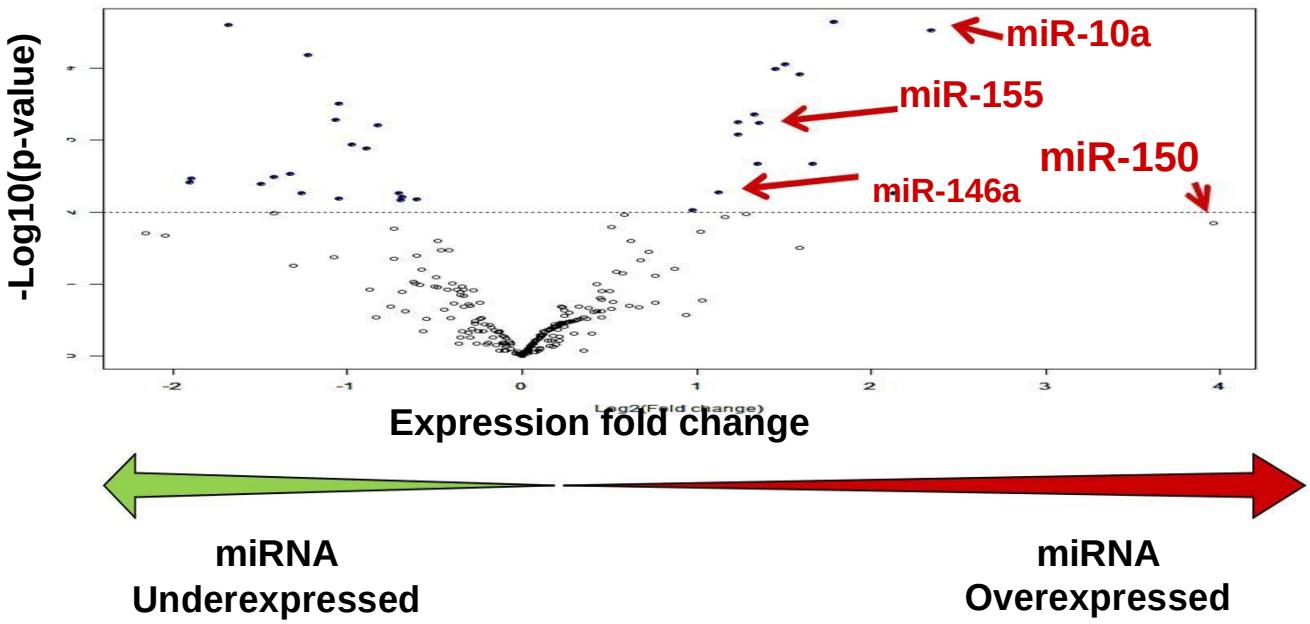


Figure 26. *Volcanoplot* de l'expression des microARN dans les deux échantillons $CD34^+CD38^{low}$ et $CD34^+CD38^+$

Chaque point représente un microARN, pour lequel le $logarithme_2$ du rapport de son expression dans les deux échantillons est représenté en abscisses, et la significativité (-$logarithme_{10}$) est représentée en ordonnées.

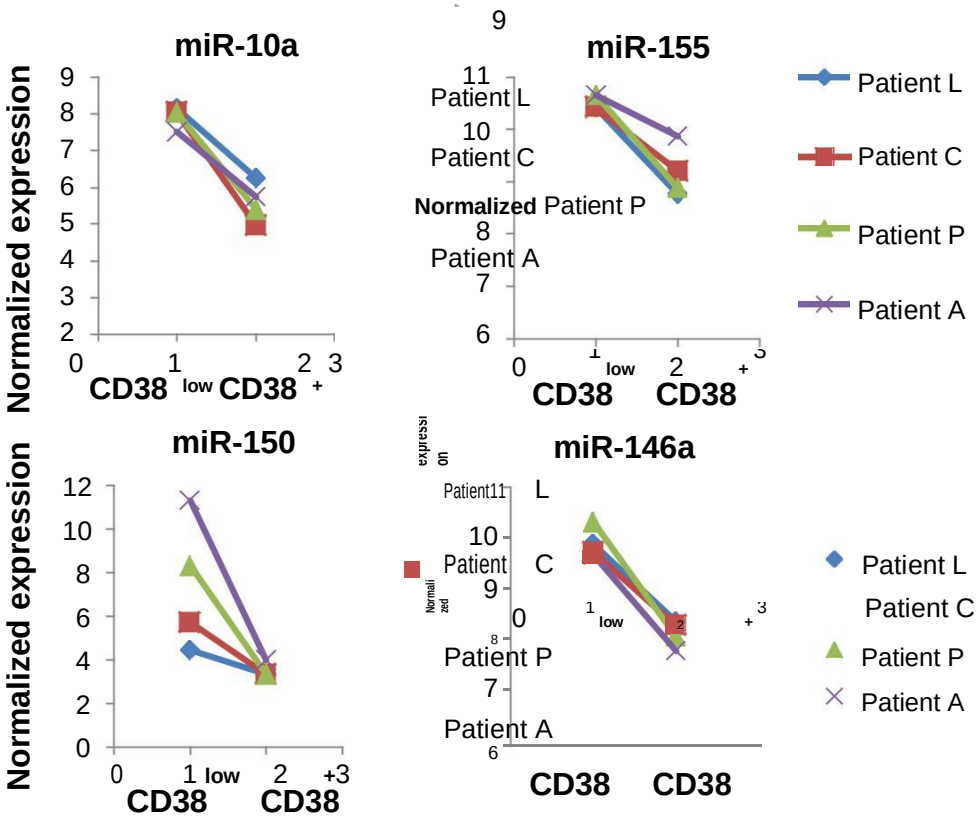


Figure 27. Expression de quatre microARN d'intérêt dans les deux échantillons $CD34^{+}CD38^{low}$ et $CD34^{+}CD38^{+}$

Pour chaque patient et pour chaque sous-population, l'expression normalisée est celle mesurée sur le *microarray*

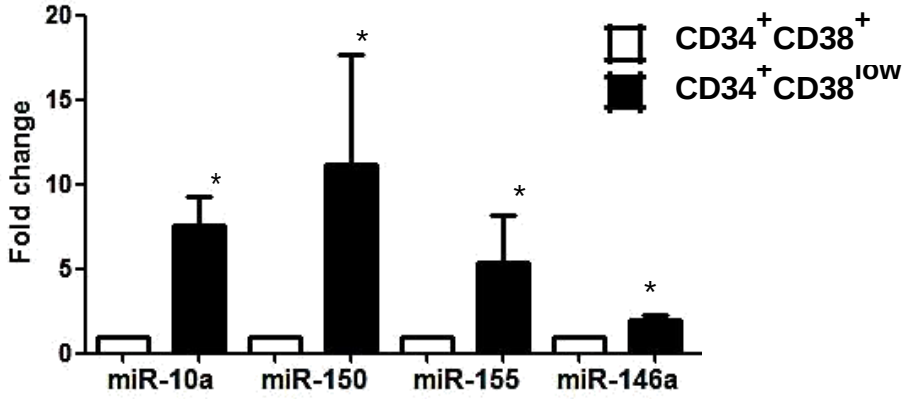


Figure 28. Confirmation par miRT-qPCR des résultats de l'analyse *microarray*

L'expression des microARN a été quantifiée par miRT-qPCR à partir des ARN des patients LMC utilisés pour l'analyse par *microarray*. Fold change : 2^-ddCt.
* p<0.05 (test de Mann-Whitney)

que la valeur de p qui lui est associée soit légèrement supérieure à 0.05, et qu'il n'apparaisse donc pas dans la *heatmap* de la figure 24. Malgré cela, le fait qu'il soit en moyenne 16 fois plus exprimé dans la fraction CSPH-LMC nous a poussé à l'inclure dans la liste des microARN d'intérêt.

Enfin, l'enrichissement de miR-146a dans la fraction $CD34^{+}CD38^{low}$ contenant les cellules souches est cohérent : plusieurs études rapportent son rôle potentiel dans le maintien des propriétés de la CSH[158]. miR-486 et miR-223 sont au contraire surexprimés significativement dans la fraction progéniteurs/précurseurs ($CD34^{+}CD38^{+}$), ce qui était attendu car il sont respectivement des marqueurs de la différenciation erythroïde et myéloïde[167,226].

c. *Confirmation par miRT-qPCR*

Pour la suite de notre étude, nous avons choisi de nous focaliser sur les microARN surexprimés dans la fraction CSPH-LMC / $CD34^{+}CD38^{low}$ compte tenu de données de la littérature résumées plus bas. Dans un premier temps, l'expression des microARN miR-10a, miR-150, miR-155 et miR-146a a été étudiée par miRT-qPCR à partir des mêmes ARN que ceux qui avaient étés hybridés sur les *microarrays*. Dans ces expériences comme dans les suivantes, les microARN miR-19b, miR-20a, miR-21, miR-23a, miR-27a et let-7c étaient également amplifiés: l'analyse *microarray* montre en effet qu'ils sont exprimés au même niveau dans les deux sous-populations, et il a été choisi d'utiliser la moyenne de leurs Ct (*cycle treshold*) pour normaliser l'expression des quatre microARN d'intérêt. La figure 28 confirme l'enrichissement significatif ($p<0.05$, test de Mann-Whitney) de miR-10a, miR-150, miR-155 et miR-146a dans la fraction CSPH-LMC ($CD34^{+}CD38^{low}$). Ces résultats ont été complétés par analyse miRT-qPCR des sous-populations $CD34^{+}CD38^{low}$ et $CD34^{+}CD38^{+}$ préparées à partir de moelles osseuses de patients LMC au diagnostic, et n'ayant pas été congelées. Les résultats obtenus sont relativement variables entre les patients, ce qui motive le choix de les présenter séparément (figure 29). Cette relative variabilité (voir par exemple l'enrichissement de miR-10a) pourrait refléter l'hétérogénéité des populations cellulaires issues des prélèvements des patients au moment du diagnostic. Cependant, la tendance à l'enrichissement de la fraction $CD34^{+}CD38^{low}$ en miR-10a (4 patients/4),

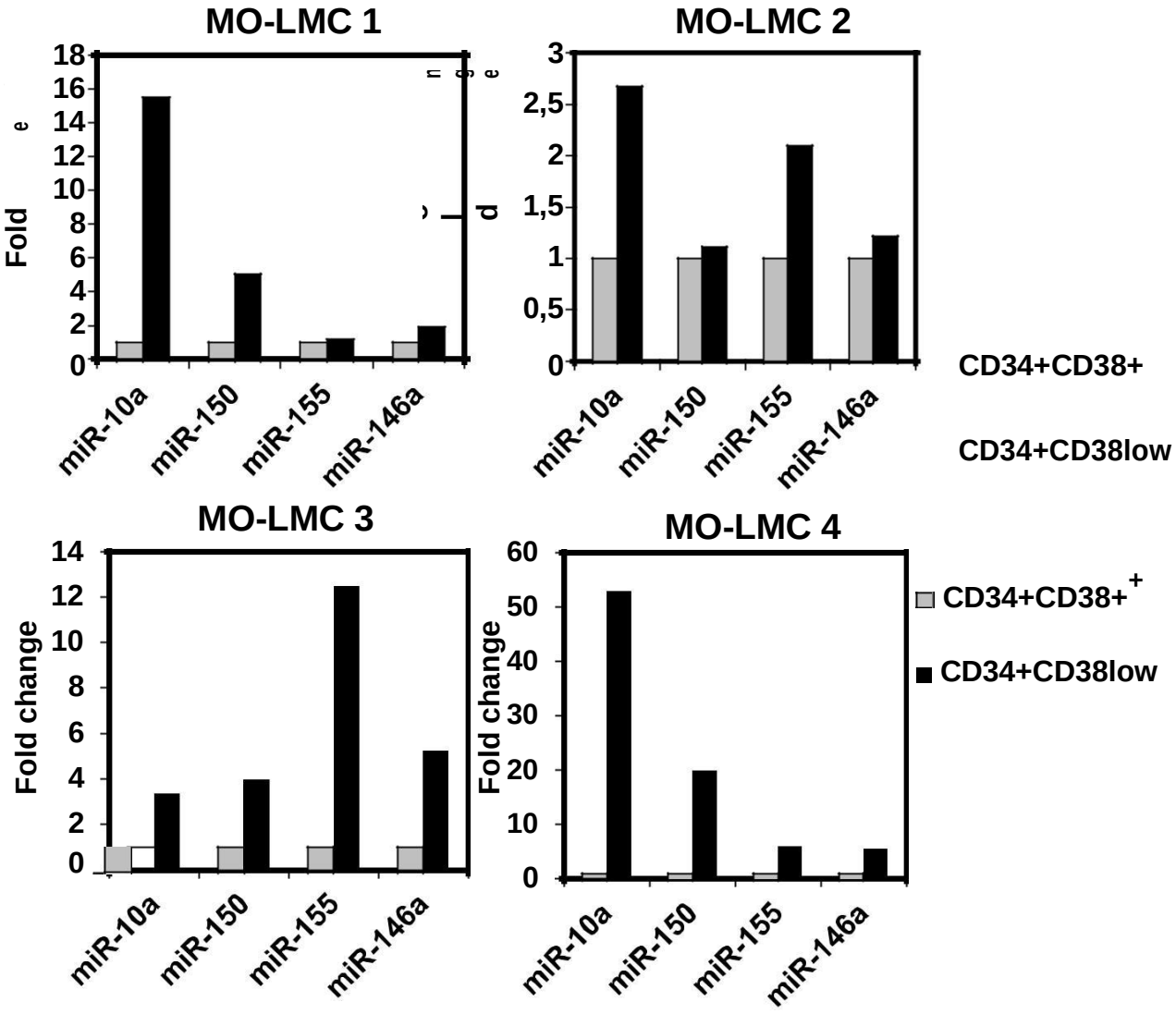


Figure 29. Confirmation de l'enrichissement des microARN candidat dans les CSPH de moelles osseuses de patients LMC au diagnostic.

L'expression des microARNs d'intérêt a été quantifiée entre les fractions $CD34^{+}CD38^{low}$ et $CD34^{+}CD38^{+}$ de quatre moelle osseuses de patients LMC au diagnostic (MO-LMC1 à 4).

miR-150 (3 patients/4), miR-155 (3 patients/4) et miR-146a (2 ou 3 patients/4) se confirme.

3. Expression des microARN miR-10a, miR-150, miR-155 et miR-146a dans les fractions CSPH ($CD34^+CD38^{low}$) normales.

L'objectif étant de chercher à identifier si l'expression de certains microARN est spécifique à la fraction CSH-LMC, nous avons quantifié miR-10a, miR-150, miR-155 et miR-146a dans des sous-populations $CD34^+CD38^{low}$ et $CD34^+CD38^+$ préparées à partir de sangs de cordons ombilicaux (SC) qui nous ont été fournis par le service maternité de la Maison de Santé Protestante de Bagatelle.

a. *Quantification de miR-10a, miR-150, miR-155 et miR-146a dans les sangs de cordons*

Les fractions $CD34^+CD38^{low}$ (CSPH) et $CD34^+CD38^+$ (progéniteurs/précurseurs) de six prélèvements de sang de cordons ombilicaux ont été triées selon le même principe que celui utilisé les échantillons de LMC. Après préparation des ARN, les quatre microARN d'intérêt ont été quantifiés par miRT-qPCR. La figure 30 présente les résultats obtenus : si miR-10a et miR-146 sont significativement enrichis dans la fraction cellulaire CSPH-SC par rapport à la fraction progéniteurs/précurseurs, miR-150 et miR-155 ne le sont pas. Ces résultats suggèrent que les microARN miR-10a et miR-146a semblent être des marqueurs de populations immatures générales, alors que miR-150 et miR-155 semblent présenter un enrichissement propre aux CSPH-LMC.

b. *Comparaison des populations CD34+CD38low normales et LMC*

Les études de Jurkovicova et al. et Machovà et al. s'accordent à montrer que les microARN mir-10a et miR-150 sont sous-exprimés dans des échantillons de sang périphérique de patients LMC, tandis que miR-155 est surexprimé[108,203]. Cependant, les résultats concernant miR-155 sont contradictoires avec l'étude de Fallah et al. qui montre que miR-155 est au contraire sous-exprimé dans la LMC[202]. Afin de conforter ou d'infirmer ces publications, nous avons alors comparé l'expression de ces différents microARN entre les fractions CSPH-LMC (cytaphérèses et moelles osseuses) et CSPH normales (sangs de cordon). Nous nous sommes basés pour cela sur nos données de

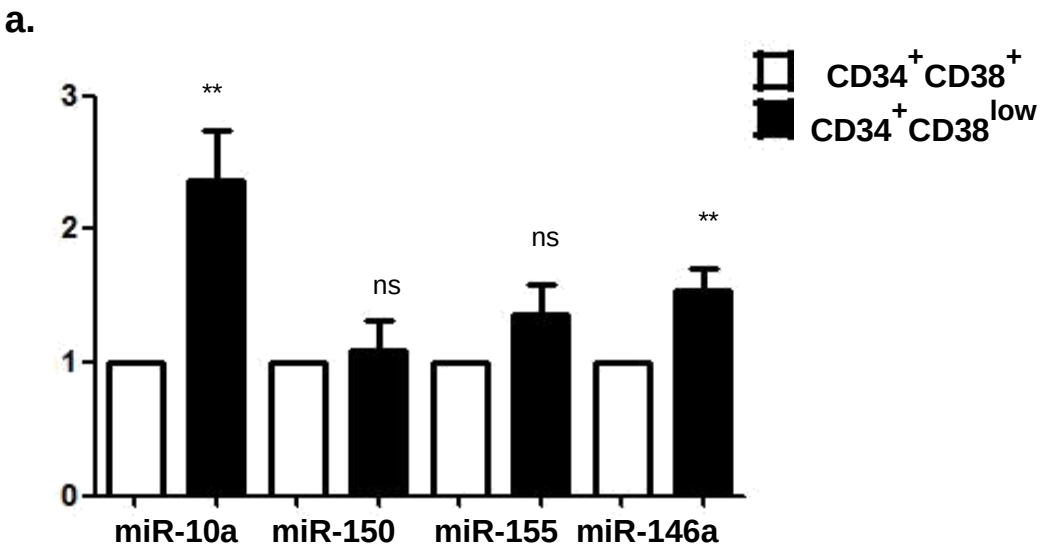


Figure 30. Quantification des microARN d'intérêt dans les CSPH d'individus sains (sangs de cordons)

L'expression des microARN d'intérêt a été quantifiée par RT-qPCR dans les fractions $CD34^{+}CD38^{low}$ et $CD34^{+}CD38^{+}$ de six préparations de sangs de cordons. ** $p<0.01$ (test Mann-Whitney)

miRT-qPCR. Les résultats présentés dans la figure 31 montrent une expression significativement plus faible des microARN miR-10a, miR-150 et miR-155 dans la fraction CSPH-LMC par rapport aux CSPH de sangs de cordon. Ils confirment donc en partie les données des travaux cités précédemment concernant miR-10a et miR-150. miR-146 n'est pas exprimé de manière différente entre les CSPH normales et LMC.
Une hypothèse concernant l'expression différentielle de miR-10a, miR-150 et miR-155 serait que l'activité de BCR-ABL1 modifie l'expression de ces microARN.

IV. Discussion et perspectives

1. Lien entre les microARN identifiés, CSH et BCR-ABL1

a. *miR-146a*

La famille des microARN miR-146 compte deux membres: miR-146a et mir-146b, positionnés respectivement sur les chromosomes 5 et 10. Leurs séquences ne diffèrent que de deux nucléotides situés en 3'[102]. L'étude de Taganov et al. est la première à proposer un mécanisme de régulation de l'expression de miR-146a et son rôle dans la régulation de la réponse innée du système immunitaire[289]. Les ARNm cibles identifiées dans cette étude, TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) et IRAK1 (IL-1 receptor-associated kinase 1) sont largement confirmées aujourd'hui et le rôle de miR-146a/b dans régulation des voies de tranduction du signal extracellulaire dépendant des cytokines se précise[158,289]. Zhao et al. montrent notamment en 2013 sur un modèle *in vivo* que son expression est importante pour le maintien du nombre de CSH. Le promoteur de miR-146a est régulé par les facteurs de transcription AP-1 et STAT3[102].

Le rôle de miR-146 dans le contexte oncogénique est complexe et dépendant du modèle cellulaire étudié. En effet, comme cela a déjà été discuté dans l'introduction, miR-146 peut tantôt jouer un rôle anti-tumoral (modèle de cancer de la prostate, cancer gastrique, gliomes) et tantôt favoriser l'oncogenèse (modèles de cancer de l'utérus, cancer de la thyroide)[158]. Peu d'études lient à ce jour l'expression de miR-146 à la leucémogenèse : seule celle de Flamant et al. montre que miR-146a est sous-exprimé dans le sang périphérique de patients LMC et que son expression semble

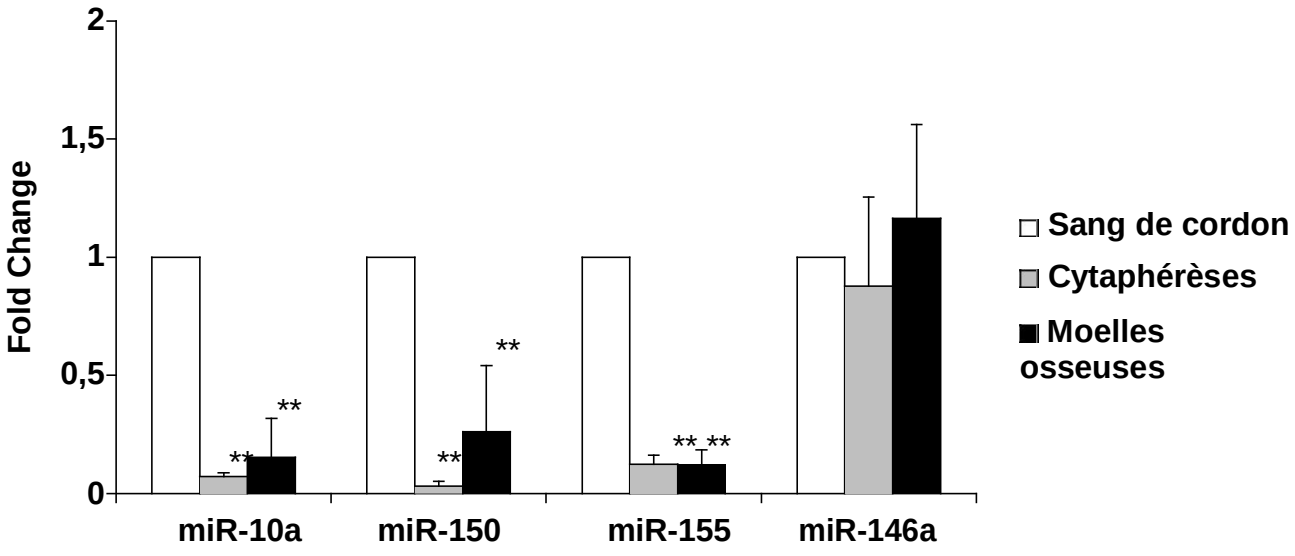


Figure 31. Comparaison de l'expression des quatre microARN d'intérêt dans les CSPH de sangs de cordons, les cytaphérèses et les moelles osseuses de patients LMC au diagnostic.

L'expression des microARN d'intérêt a été quantifiée par RT-qPCR dans la fraction $CD34^{+}CD38^{low}$ d'un sang de cordon (utilisé comme contrôle), de quatre cytaphérèses LMC et quatre moelles osseuses LMC. **p< 0.01 (test Mann-Whitney)

dépendante de l'activité de BCR-ABL1. De ce fait, aucune étude fonctionnelle n'a été effectuée à ce jour dans ce modèle.

b. *miR-10a*

La famille miR-10 compte les microARN miR-10a et miR-10b, dont les gènes ont la particularité d'être inclus dans le cluster des gènes régulateurs du développement *Hox*. Le microARN miR-10a est bien conservé entre les espèces, et l'un de ses rôles concerne la régulation des étapes du développement[19]. Il constitue un exemple rare de la fixation potentielle des microARN dans des régions autre que les 3' non-codant des ARN messagers cibles. En effet, Ørom et al. montrent en 2008 qu'il est capable d'activer la traduction de protéines ribosomales en se fixant au niveau de sa région 5' non-codante du transcrit de MHC[43].

Dans le contexte leucémique, mir-10a est surtout associé à un sous-type de leucémie aigue myéloblastique (LAM) présentant la mutation NPM1. Les nombreuses études rapportant son rôle dans la leucémogenèse de ce type de LAM le placent même en troisième position des éléments déterminants dans l'évolution de la maladie[19]. De façon étonnante, son étude dans le contexte de la LMC n'a été que récemment exploré. En effet, les travaux de Machovà et al. montrent qu'il semble sous-exprimé dans les échantillons de sang périphérique et de $CD34^+$ de patients LMC[203]. D'autre part, les études de Flamant et al. et Agirre at al., montrent que son expression semble corrélée à l'activité de BCR-ABL1 et à l'évolution de la maladie vers sa phase blastique[205,207]. Cependant son rôle n'est pas encore clairement déterminé, bien que l'étude d'Agirre et al. suggère que sa régulation est importante dans la prolifération cellulaire des lignées leucémiques[205].

c. *miR-150*

Le microARN miR-150 est un élément central de la régulation de l'hématopoïèse normale et pathologique. En effet, son expression est un marqueur spécifique de la lignée lymphoïde et son rôle dans le maintien de la réponse immunitaire a été largement rapporté[290,291]. Emembaukus et al. montrent d'autre part son rôle dans la régulation de la différenciation myéloïde à travers le ciblage du facteur de transcription MYB[292].

Dans le contexte leucémique, plusieurs études démontrent d'abord clairement par miRT-qPCR et analyses *microarray* que miR-150 semble sous-exprimé dans les cellules primaires de patients LMC en phase chronique, suggérant un rôle de celui-ci dans la leucémogenèse[202,205]. L'étude de Flamant et al., confirme ces données et démontrent également qu'il ne constitue pas un marqueur de distinction entre la phase chronique et la phase blastique de la maladie[207]. Ces résultats suggèrent d'autre part que MYB constitue également une cible de miR-150 dans le contexte de la LMC.
L'étude de Basova et al. montre enfin que l'activité de BCR-ABL1, associée à la diminution d'expression de miR-150, constitue un mécanisme d'activation de la voie oncogénique MYB/miR-155/PU.1 en induisant un blocage de la différenciation des cellules[293]. Ces travaux suugèrent d'autre part que ce blocage pourrait constituer un élément important dans la réponse de persistance des cellules immatures de LMC aux ITK.

d. *miR-155*

Le gène du microARN miR-155 est identifié pour la première fois en 2002 par Lagos-Quitina et al. pour être localisé au sein du gène *bic* dans le modèle murin[4].

Très peu de travaux sont actuellement publiés concernant son rôle potentiel dans la leucémogenèse. Ce sujet mériterait d'être approfondi puisque les analyses de Machová et al. sur des échantillons de sang périphérique de patients LMC résistants et répondeurs montrent que son surexpression semble associée au phénomène de résistance aux traitements ITK[203]. O'Connel et al. montrent d'autre part dans des modèles murins que la surexpression de miR-155 dans des cellules souches induit une dérégulation de l'hématopoièse normale en faveur de cellules à l'aspect plus granuleux, ainsi qu'une formule sanguine présentant moins d'érythrocytes et de lymphocytes[294]. L'analyse par *microarray* effectuée sur des cellules modèles surexprimant miR-155 montre également une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la différenciation myéloïde (Bach1, Sla, CutL1), ce qui semble corrélé avec le phénotype myéloïde de la LMC. Enfin, l'étude de Flamant et al. précédemment citée suggère que miR-155 est une cible du facteur de transcription MYB et que son activation transcriptionnelle semble liée au blocage de la différenciation des progéniteurs de LMC[206].

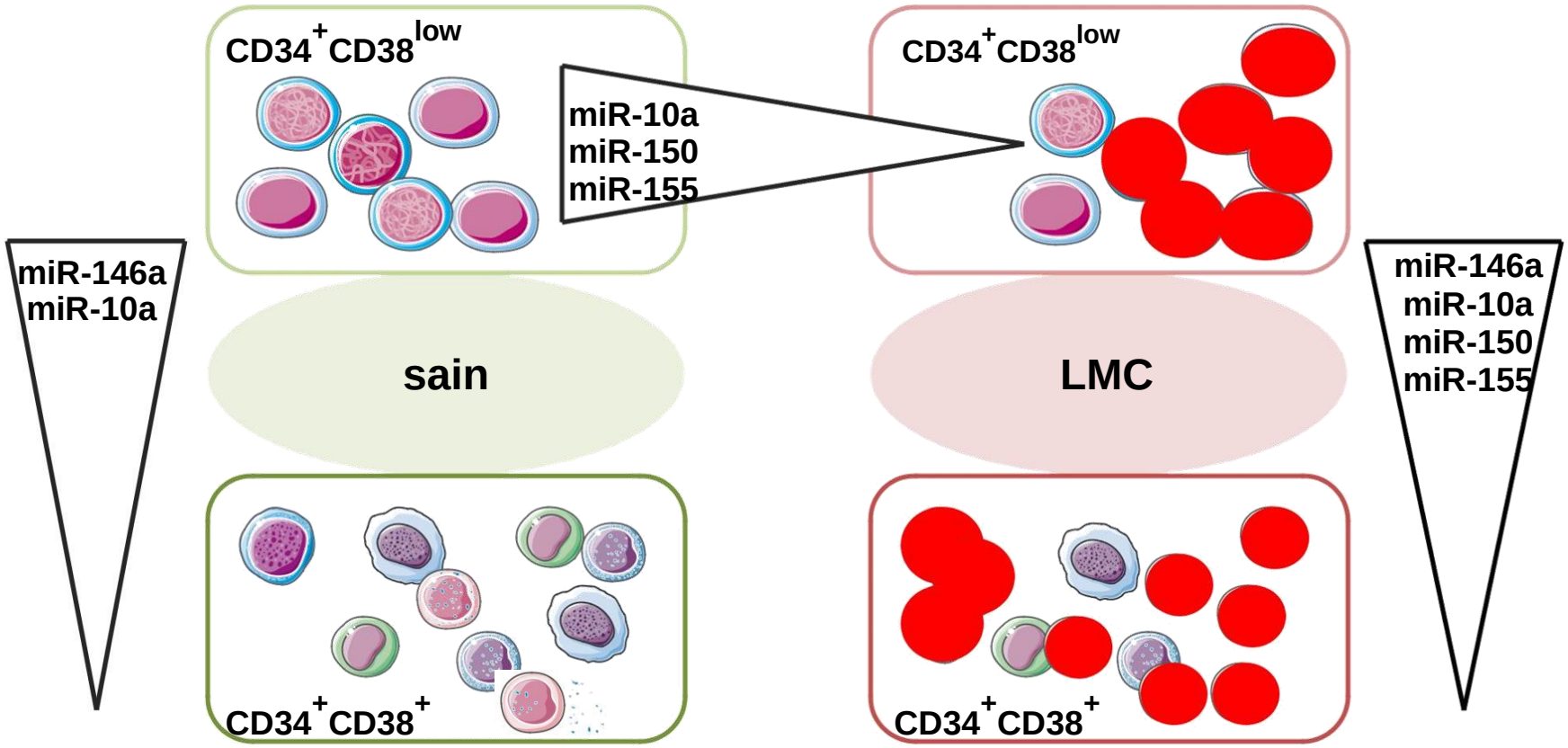


Figure 32. Schéma général de l'expression des microARN entre les fractions CSPH et progéniteurs/précurseurs de LMC et sains.

Les populations CSPH ($CD34^{+}CD38^{low}$) sont enrichies en CSH. Les résultats suggèrent que l'enrichissement des microARN miR-10a et miR-146a est caractéristique des fractions CSPH normales et leucémique tandis que l'enrichissement des microARN miR-150 et miR-155 est propre à la fraction CSPH-LMC. D'autre part, les données suggèrent que les microARN miR-10a, miR-150 et miR-155 sont sous-exprimés entre les fractions CSPH normales et CSPH-LMC, soulignant le rôle potentiel de BCR-ABL1 dans la régulation de leur expression.

L‘objectif de notre étude a été d'identifier des microARN spécifiquement exprimés dans les CSHP-LMC afin d‘étudier à terme leurs rôles potentiels dans le maintien, la survie et la persistance de celle-ci lors des traitements ITK. Les résultats obtenus sont résumés dans le schéma général ci-contre (figure 32). Par analyse *microarray* et miRT-qPCR, nous avons dans un premier temps démontré que les CSPH-LMC présentent leur propre profil d‘expression microARN par rapport aux cellules moins immatures ($CD34^+CD38^+$). Nous avons ensuite déterminé que les microARN miR-10a, miR-150, miR-155 et miR-146 étaient spécifiquement surexprimés dans les CSHP-LMC par rapport aux progéniteurs/précurseurs. La comparaison de l‘expression de ces microARN avec des échantillons sains (sangs de cordon) a également permis de mettre en évidence que l‘enrichissement des microARN miR-150 et miR-155 semblent spécifique au contexte leucémique. D‘autre part, nos résultats complètent les études de Jurkovicova et al., et Machova at al., en montrant que les microARN miR-10a, miR-150 et miR-155 sont sous-exprimées dans les cellules LMC par rapport aux sangs de cordon[108,203], mais que cette sous-expression est également effective dès le compartiment enrichi en cellule souche (CSPH). L‘ensemble de ces résultats suggèrent donc que la modulation d‘expression de ces microARN spécifiques pourrait être liée à la présence de BCR-ABL1 dans la population CSPH-LMC. L‘étude fonctionnelle de ces microARN dans le contexte de la LMC permettrait donc de mieux caractériser ces populations cellulaires persistantes aux traitements.

2. Perspectives

La poursuite logique de cette étude sera de s‘intéresser au rôle potentiel des microARN spécifiques du compartiment CSPH dans la leucémogenèse. La plupart des études actuellement publiées sur ce sujet montrent une sous-expression de miR-10a, miR-150, miR-155 et miR-146a dans les fractions $CD34^+$ de patients LMC par rapport aux échantillons contrôles. Elles ne distinguent cependant pas les cellules $CD34^+CD38^{low}$ et $CD34^+CD38^+$. D‘autre part, elles sont principalement focalisées sur l‘effet du traitement ITK sur l‘expression de ces microARN ou sur leur rôle potentiel dans la différenciation hématopoïétique. Il serait donc intéressant de rechercher si la surexpression de miR-10a, miR-150, miR-155 et miR-146a dans le compartiment enrichi en CSH a un lien potentiel avec l‘activité de BCR-ABL1 d'une part, et avec la persistance de ces CSH suite aux traitements ITK d'autre part. Le projet de ces études

fonctionnelles complémentaires sont présentées ci-dessous et en cours d'élaboration au laboratoire pour certaines.

a. *Etudes fonctionnelles in vivo*

L'un des objectifs des travaux en cours au laboratoire est de vérifier si les CSPH exprimant ces microARN (dites « miR^+ ») présentent une capacité de reconstitution d'hématopoièse leucémique à long terme et une insensibilité aux traitements ITK plus importante que les CSPH n'exprimant pas ces microARN. En d'autres termes, si l'expression de l'un ou l'autre des quatre microARN que nous avons étudiés est bien caractéristique des cellules souches hématopoïétiques leucémiques. Dans ce but, nous avons proposé de détecter indirectement l'expression de miR-10a/10/155/146a dans des cellules $CD34^+$ en utilisant des constructions plasmidiques et lentivirales dans lesquelles le gène de la GFP est placé sous le contrôle du promoteur des microARN.
Nous n'avons pour le moment réussi qu'à cloner les séquences promotrices spécifiques des microARN miR-155 et miR-146a, la spécificité des constructions ayant été vérifiée sur des lignées cellulaires exprimant l'un ou l'autre des microARN (résultats non montrés). Des cytaphérèses de patients LMC ont ensuite été transduites avec ces deux constructions afin de trier par cytométrie de flux les cellules présentant les marquages $CD34^+CD38^{low}GFP^+$ sensées exprimer miR-155 ou miR-146a. Cependant, nos premiers résultats (non-montrés) suggèrent que cette approche n'est pas assez sensible pour détecter une expression différentielle de mir-155 et miR-146a entre la fraction $CD34^+CD38^{low}$ (CSPH) et $CD34^+CD38^+$ (progéniteurs précurseurs). La détection de l'expression de microARN sur des cellules vivantes reste encore aujourd'hui un défi technique dans le domaine de l'étude fonctionnelle des microARN et représente probablement une limite à notre projet. Une solution pourrait être la méthode développée par l'équipe de Wang et al. en 2015 qui s'appuie sur l'utilisation de duplex artificiels de séquences correspondants au microARN d'intérêt[295]. Le brin sens est associé à une nanoparticule d'or tandis que le brin antisens est associé à une molécule fluorescente (Cyanine3). Lorsque le duplex est associé, la molécule d'or quenche la fluorescence de la Cyanine3. En revanche, si le microARN d'intérêt est présent dans les cellules transfectées par cette construction, il entre en compétition avec le brin sens marqué par la molécule d'or et se fixe à sa place au sein du duplex: la fluorescence est alors détectable. Cette méthode a notamment été adaptée par Yoo et

al. en 2016 pour le suivi *in vivo* de cellules métastatiques exprimant le microARN miR-10b[296]. Elle pourrait éventuellement nous permettre de compléter notre étude fonctionnelle des cellules $CD34^{+}CD38^{low}$ et $CD34^{+}CD38^{+}$.

b. *Etudes fonctionnelles in vitro*

Des études fonctionnelles *in vitro* sont en cours au laboratoire avec le développement de lignées modèles de LMC dont l'expression des microARN miR-10a, miR-150, miR-155 et miR-146a a été inactivée à l'aide de la technologie CRISPR. L'effet de ces *knock-out* sera mesuré sur les paramètres suivants :

- Prolifération cellulaire et sensibilité aux ITK (à l'aide du kit Cell Titer Glo®, déjà utilisé dans notre étude sur miR-21 et permettant un suivi rapide et sensible du nombre de cellules) ;
- Etat du cycle cellulaire (par marquage intracellulaire au DAPI et détection par cytométrie de flux) ;
- Réponse des cellules à l'apoptose induite par un ITK (par marquage à l'annexin V et détection par cytométrie de flux).

Ces expériences seront complétées par des études de l'effet de la surexpression des microARN sur ces mêmes paramètres.

L'équipe ayant acquis ces dernières années une expertise dans l'utilisation de la technologie CRISPR/Cas9, un objectif à moyen terme sera d'étudier les fonctions de miR-10a, miR-150, miR-155 et miR-146a dans des cellules primaires de patients LMC, afin de confirmer les résultats obtenus sur les lignées.

BIBLIOGRAPHIE

1. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 75, 843–854 (1993).
2. Pasquinelli, A. E. *et al.* Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408, 86–89 (2000).
3. Witkos, T. M., Koscianska, E. & Krzyzosiak, W. J. Practical Aspects of microRNA Target Prediction. *Curr. Mol. Med.* 11, 93–109 (2011).
4. Lagos-Quintana, M. Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science* 294, 853–858 (2001).
5. Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G. & Bartel, D. P. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans. *Science* 294, 858–862 (2001).
6. Kim, V. N., Han, J. & Siomi, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 126–139 (2009).
7. van Rooij, E. *et al.* A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev. Cell* 17, 662–673 (2009).
8. Mathelier, A. & Carbone, A. Large scale chromosomal mapping of human microRNA structural clusters. *Nucleic Acids Res.* 41, 4392–4408 (2013).
9. Olena, A. F. & Patton, J. G. Genomic Organization of microRNAs. *J. Cell. Physiol.* 222, 540–545 (2010).
10. Lee, Y. *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415–419 (2003).
11. Borchert, G. M., Lanier, W. & Davidson, B. L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 1097–1101 (2006).
12. Cai, X. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10, 1957–1966 (2004).
13. Lee, Y. *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23, 4051–4060 (2004).
14. Ozsolak, F. *et al.* Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev.* 22, 3172 (2008).
15. Canella, D., Praz, V., Reina, J. H., Cousin, P. & Hernandez, N. Defining the RNA polymerase III transcriptome: Genome-wide localization of the RNA polymerase III transcription machinery in human cells. *Genome Res.* 20, 710–721 (2010).
16. Ameres, S. L. & Zamore, P. D. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 475–488 (2013).
17. Du, T. & Zamore, P. D. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Dev. Camb. Engl.* 132, 4645–4652 (2005).
18. Mu, P. *et al.* Genetic dissection of the miR-17~92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas. *Genes Dev.* 23, 2806–2811 (2009).
19. Lund, E. Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science* 303, 95–98 (2004).
20. Han, J. *et al.* Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 125, 887–901 (2006).

21. Gwizdek, C. *et al.* Minihelix-containing RNAs mediate exportin-5-dependent nuclear export of the double-stranded RNA-binding protein ILF3. *J. Biol. Chem.* 279, 884–891 (2004).
22. Zeng, Y. & Cullen, B. R. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res.* 32, 4776–4785 (2004).
23. MacFarlane, L.-A. & Murphy, P. R. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr. Genomics* 11, 537–561 (2010).
24. Ha, M. & Kim, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 509–524 (2014).
25. Meister, G. *et al.* Human Argonaute2 Mediates RNA Cleavage Targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* 15, 185–197 (2004).
26. Paroo, Z., Ye, X., Chen, S. & Liu, Q. Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling. *Cell* 139, 112–122 (2009).
27. Svobodova, E., Kubikova, J. & Svoboda, P. Production of small RNAs by mammalian Dicer. *Pflugers Arch.* 468, 1089–1102 (2016).
28. Burroughs, A. M. *et al.* Deep-sequencing of human argonaute-associated small RNAs provides insight into miRNA sorting and reveals argonaute association with RNA fragments of diverse origin. *RNA Biol.* 8, 158–177 (2011).
29. Dueck, A., Ziegler, C., Eichner, A., Berezikov, E. & Meister, G. microRNAs associated with the different human Argonaute proteins. *Nucleic Acids Res.* 40, 9850–9862 (2012).
30. Khvorova, A., Reynolds, A. & Jayasena, S. D. Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. *Cell* 115, 209–216 (2003).
31. Báez-Vega, P. M. *et al.* Targeting miR-21-3p inhibits proliferation and invasion
32. Ge, Y., Zhang, L., Nikolova, M., Reva, B. & Fuchs, E. Strand-specific$_*$ in vivo screen of cancer-associated miRNAs unveils a role for miR-21( ) in SCC progression. *Nat. Cell Biol.* 18, 111–121 (2016).
33. Westholm, J. O. & Lai, E. C. Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie* 93, 1897–1904 (2011).
34. Lin, S.-L., Chang, D., Wu, D.-Y. & Ying, S.-Y. A novel RNA splicing-mediated gene silencing mechanism potential for genome evolution. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310, 754–760 (2003).
35. Ladewig, E., Okamura, K., Flynt, A. S., Westholm, J. O. & Lai, E. C. Discovery of hundreds of mirtrons in mouse and human small RNA data. *Genome Res.* 22, 1634–1645 (2012).
36. Cheloufi, S., Dos Santos, C. O., Chong, M. M. W. & Hannon, G. J. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* 465, 584–589 (2010).
37. O'Carroll, D. *et al.* A Slicer-independent role for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNA pathway. *Genes Amp Dev.* 21, 1999–2004 (2007).
38. Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19, 92–105 (2009).
39. Bartel, D. P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* 136, 215–233 (2009).
40. Ghildiyal, M. & Zamore, P. D. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat. Rev. Genet.* 10, 94–108 (2009).
41. Reinhart, B. J. *et al.* The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans. *Nature* 403, 901–906 (2000).[36321–36337(2016).ofovariancancercells.]

42. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N. & Sonenberg, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* 9, 102–114 (2008).
43. Ørom, U. A., Nielsen, F. C. & Lund, A. H. MicroRNA-10a binds the 5‘UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol. Cell* 30, 460–471 (2008).
44. Bourassa, M. W. & Ratan, R. R. The interplay between microRNAs and histone deacetylases in neurological diseases. *Neurochem. Int.* 77, 33–39 (2014).
45. Hartmann, C., Corre-Menguy, F., Boualem, A., Jovanovic, M. & Lelandais-Brière, C. [MicroRNAs: a new class of gene expression regulators]. *Med. Sci. MS* 20, 894–898 (2004).
46. Meyer, K. D. *et al.* Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3‘ UTRs and near stop codons. *Cell* 149, 1635–1646 (2012).
47. Iliopoulos, D., Malizos, K. N., Oikonomou, P. & Tsezou, A. Integrative MicroRNA and Proteomic Approaches Identify Novel Osteoarthritis Genes and Their Collaborative Metabolic and Inflammatory Networks. *PLOS ONE* 3, e3740 (2008).
48. Zhou, X., Duan, X., Qian, J. & Li, F. Abundant conserved microRNA target sites in the 5‘-untranslated region and coding sequence. *Genetica* 137, 159–164 (2009).
49. Guo, S. *et al.* MicroRNA miR-125a controls hematopoietic stem cell number. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 14229–14234 (2010).
50. Pfaff, J. *et al.* Structural features of Argonaute-GW182 protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E3770-3779 (2013).
51. Kim, Y. & Kim, V. N. MicroRNA factory: RISC assembly from precursor microRNAs. *Mol. Cell* 46, 384–386 (2012).
52. Fabian, M. R. & Sonenberg, N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 586–593 (2012).
53. Liu, J., Valencia-Sanchez, M. A., Hannon, G. J. & Parker, R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell Biol.* 7, 719–723 (2005).
54. Engels, B. M. & Hutvagner, G. Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. *Oncogene* 25, 6163–6169 (2006).
55. Eulalio, A., Huntzinger, E. & Izaurralde, E. GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 346–353 (2008).
56. Tritschler, F., Huntzinger, E. & Izaurralde, E. Role of GW182 proteins and PABPC1 in the miRNA pathway: a sense of déjà vu. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 379–384 (2010).
57. Behm-Ansmant, I. *et al.* A previously unidentified activity of yeast and mouse RNA:pseudouridine synthases 1 (Pus1p) on tRNAs. *RNA N. Y. N* 12, 1583–1593 (2006).
58. Braun, J. E., Huntzinger, E., Fauser, M. & Izaurralde, E. GW182 proteins directly recruit cytoplasmic deadenylase complexes to miRNA targets. *Mol. Cell* 44, 120–133 (2011).
59. Petit, A.-P. *et al.* The structural basis for the interaction between the CAF1 nuclease and the NOT1 scaffold of the human CCR4-NOT deadenylase complex. *Nucleic Acids Res.* 40, 11058–11072 (2012).

60. Haas, G. *et al.* HPat provides a link between deadenylation and decapping in metazoa. *J. Cell Biol.* 189, 289–302 (2010).
61. Lu, J. *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435, 834–838 (2005).
62. Calin, G. A. & Croce, C. M. Genomics of chronic lymphocytic leukemia microRNAs as new players with clinical significance. *Semin. Oncol.* 33, 167–173 (2006).
63. Mavrakis, K. J. & Wendel, H.-G. TargetScreen: an unbiased approach to identify functionally important microRNA targets. *Cell Cycle Georget. Tex* 9, 2080–2084 (2010).
64. Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P. & Anderson, T. A. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev. Biol.* 302, 1–12 (2007).
65. Metzler, M., Wilda, M., Busch, K., Viehmann, S. & Borkhardt, A. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes. Chromosomes Cancer* 39, 167–169 (2004).
66. O'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Zeller, K. I., Dang, C. V. & Mendell, J. T. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 435, 839–843 (2005).
67. Peng, Y. & Croce, C. M. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.* 1, 15004 (2016).
68. Wang, B. *et al.* Reciprocal regulation of microRNA-122 and c-Myc in hepatocellular cancer: role of E2F1 and transcription factor dimerization partner 2. *Hepatol. Baltim. Md* 59, 555–566 (2014).
69. Napoli, M. & Flores, E. R. The p53 family orchestrates the regulation of metabolism: physiological regulation and implications for cancer therapy. *Br. J. Cancer* (2016). doi:10.1038/bjc.2016.384
70. Hermeking, H. p53 enters the microRNA world. *Cancer Cell* 12, 414–418 (2007).
71. Suzuki, H. I. *et al.* Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* 460, 529–533 (2009).
72. Lujambio, A. & Lowe, S. W. The microcosmos of cancer. *Nature* 482, 347
73. Walz, A. L. *et al.* Recurrent DGCR8, DROSHA, and SIX Homeodomain Mutations in Favorable Histology Wilms Tumors. *Cancer Cell* 27, 286 (2015).
74. Karube, Y. *et al.* Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci.* 96, 111–115 (2005).
75. Melo, S. A. *et al.* A genetic defect in exportin-5 traps precursor microRNAs in the nucleus of cancer cells. *Cancer Cell* 18, 303–315 (2010).
76. Costa, F. F. Epigenomics in cancer management. *Cancer Manag. Res.* 2, 255 (2010).
77. Saito, Y. *et al.* Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 9, 435–443 (2006).
78. Donzelli, S. *et al.* Epigenetic silencing of miR-145-5p contributes to brain metastasis. *Oncotarget* 6, 35183–35201 (2015).
79. Lujambio, A. *et al.* A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 13556–13561 (2008).
80. Fabbri, M. *et al.* MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 15805–15810 (2007).

81. Varambally, S. *et al.* Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science* 322, 1695–1699 (2008).
82. Volinia, S. *et al.* A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2257–2261 (2006).
83. Faraoni, I., Antonetti, F. R., Cardone, J. & Bonmassar, E. miR-155 gene: A typical multifunctional microRNA. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1792, 497–505 (2009).
84. Sun, S., Sun, P., Wang, C. & Sun, T. Downregulation of microRNA-155 accelerates cell growth and invasion by targeting c-myc in human gastric carcinoma cells. *Oncol. Rep.* 32, 951–956 (2014).
85. O'Connell, R. M. *et al.* Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J. Exp. Med.* 205, 585–594 (2008).
86. Merhautova, J. *et al.* miR-155 and miR-484 Are Associated with Time to Progression in Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated with Sunitinib. *ResearchGate* 2015, 1–5 (2015).
87. Pfeffer, S. R., Yang, C. H. & Pfeffer, L. M. The Role of miR-21 in Cancer. *Drug Dev. Res.* 76, 270–277 (2015).
88. Buscaglia, L. E. B. & Li, Y. Apoptosis and the target genes of microRNA-21. *Chin. J. Cancer* 30, 371–380 (2011).
89. Liu, L.-Z. *et al.* MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1α expression. *PloS One* 6, e19139 (2011).
90. Asangani, I. A. *et al.* MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* 27, 2128–2136 (2008).
91. Medina, P. P., Nolde, M. & Slack, F. J. OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature* 467, 86–90 (2010).
92. He, L. *et al.* A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435, 828–833 (2005).
93. Mogilyansky, E. & Rigoutsos, I. The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. *Cell Death Differ.* 20, 1603–1614 (2013).
94. Zhu, H., Han, C. & Wu, T. MiR-17-92 cluster promotes hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 36, 1213–1222 (2015).
95. Hayes, J., Peruzzi, P. P. & Lawler, S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol. Med.* 20, 460–469 (2014).
96. Boyerinas, B., Park, S.-M., Hau, A., Murmann, A. E. & Peter, M. E. The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 17, F19–F36 (2010).
97. Madison, B. B. *et al.* Let-7 Represses Carcinogenesis and a Stem Cell Phenotype in the Intestine via Regulation of Hmga2. *PLOS Genet.* 11, e1005408 (2015).
98. Pekarsky, Y. & Croce, C. M. Role of miR-15/16 in CLL. *Cell Death Differ.* 22, 6–11 (2015).
99. Huang, E., Liu, R. & Chu, Y. MiRNA-15a/16: As tumor suppressors and more. *ResearchGate* 11, 2351–63 (2015).
100. Aqeilan, R. I., Calin, G. A. & Croce, C. M. miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. *Cell Death Differ.* 17, 215–220 (2009).

101. Cimmino, A. *et al.* miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102,** 13944–13949 (2005).
102. Labbaye, C. & Testa, U. The emerging role of MIR-146A in the control of hematopoiesis, immune function and cancer. *J. Hematol. Oncol.J Hematol Oncol* **5,** 13 (2012).
103. Paik, J. H. *et al.* MicroRNA-146a downregulates NFκB activity via targeting TRAF6 and functions as a tumor suppressor having strong prognostic implications in NK/T cell lymphoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **17,** 4761–4771 (2011).
104. Schwarzenbach, H., Nishida, N., Calin, G. A. & Pantel, K. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **11,** 145–156 (2014).
105. Ghai, V. & Wang, K. Recent progress toward the use of circulating microRNAs as clinical biomarkers. *Arch. Toxicol.* **90,** 2959–2978 (2016).
106. Hansen, T. F., Carlsen, A. L., Heegaard, N. H. H., Sørensen, F. B. & Jakobsen, A. Changes in circulating microRNA-126 during treatment with chemotherapy and bevacizumab predicts treatment response in patients with metastatic colorectal cancer. *Br. J. Cancer* **112,** 624–629 (2015).
107. Chen, Q., Yang, L., Xiao, Y., Zhu, J. & Li, Z. Circulating microRNA-182 in plasma and its potential diagnostic and prognostic value for pancreatic cancer. *Med. Oncol.* **31,** 225 (2014).
108. Jurkovicova, D. *et al.* microRNA expression profiling as supportive diagnostic and therapy prediction tool in chronic myeloid leukemia. *Neoplasma* **62,** 949–958 (2015).
109. Seita, J. & Weissman, I. L. Hematopoietic Stem Cell: Self-renewal versus Differentiation. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **2,** 640–653 (2010).
110. Eaves, C. J. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood* **125,** 2605–2613 (2015).
111. Mcculloch, E. A. & Till, J. E. The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. *Radiat. Res.* **13,** 115–125 (1960).
112. Siminovitch, L., Mcculloch, E. A. & Till, J. E. THE DISTRIBUTION OF COLONY-FORMING CELLS AMONG SPLEEN COLONIES. *J. Cell. Physiol.* **62,** 327–336 (1963).
113. Metcalf, D. Studies on colony formation in vitro by mouse bone marrow cells. II. Action of colony stimulating factor. *J. Cell. Physiol.* **76,** 89–99 (1970).
114. Zhao, M. & Li, L. Regulation of hematopoietic stem cells in the niche. *Sci. China Life Sci.* **58,** 1209–1215 (2015).
115. Dexter, T. M., Wright, E. G., Krizsa, F. & Lajtha, L. G. Regulation of haemopoietic stem cell proliferation in long term bone marrow cultures. *Biomed. Publiee Pour AAICIG* **27,** 344–349 (1977).
116. Harrison, D. E. & Zhong, R. K. The same exhaustible multilineage precursor produces both myeloid and lymphoid cells as early as 3-4 weeks after marrow transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89,** 10134–10138 (1992).
117. Morrison, S. J. & Weissman, I. L. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* **1,** 661–673 (1994).
118. Civin, C. I. *et al.* Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **133,** 157–165 (1984).

119. Notta, F. *et al.* DISTINCT ROUTES OF LINEAGE DEVELOPMENT RESHAPE THE HUMAN BLOOD HIERARCHY ACROSS ONTOGENY. *Science* **351,** aab2116 (2016).
120. Mayani, H. The regulation of hematopoietic stem cell populations. *F1000Research* **5,** (2016).
121. Calloni, R., Cordero, E. A. A., Henriques, J. A. P. & Bonatto, D. Reviewing and Updating the Major Molecular Markers for Stem Cells. *Stem Cells Dev.* **22,** 1455–1476 (2013).
122. **Hordyjewska, A., Popiołek, Ł.** & Horecka, A. Characteristics of hematopoietic stem cells of umbilical cord blood. *Cytotechnology* **67,** 387–396 (2014).
123. Vaidya, A. & Kale, V. Hematopoietic Stem Cells, Their Niche, and the Concept of Co-Culture Systems: A Critical Review. *J. Stem Cells* **10,** 13–31 (2015).
124. Brunet de la Grange, P. *et al.* Long-term repopulating hematopoietic stem cells **and „side population' in human steady state peripheral blood.** *Stem Cell Res.* **11,** 625–633 (2013).
125. Hess, D. A. *et al.* Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. *Blood* **104,** 1648–1655 (2004).
126. Hess, D. A. *et al.* Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells. *ResearchGate* **107,** 2162–9 (2006).
127. Luis, T. C., Killmann, N. M.-B. & Staal, F. J. T. Signal transduction pathways regulating hematopoietic stem cell biology: Introduction to a series of Spotlight Reviews. *Leukemia* **26,** 86–90 (2012).
128. Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E. & Dick, J. E. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell* **10,** 120–136 (2012).
129. Bedel, A. *et al.* Variable behavior of iPSCs derived from CML patients for response to TKI and hematopoietic differentiation. *PloS One* **8,** e71596 (2013).
130. Charaf, L. *et al.* Effect of tyrosine kinase inhibitors on stemness in normal and chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia* (2016). doi:10.1038/leu.2016.154
131. Patt, H. M. & Maloney, M. A. Influence of time of x-irradiation on the regenerative process after localized bone marrow depletion. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* **133,** 627–631 (1970).
132. Schofield, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4,** 7–25 (1978).
133. Malfuson, J.-V. *Rôle de la niche mésenchymateuse dans la régulation du phénotype SP des progéniteurs hématopoïétiques humains*. (Paris 11, 2013).
134. Mendelson, A. & Frenette, P. S. Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nat. Med.* **20,** 833–846 (2014).
135. Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M. & Nagasawa, T. Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches. *Immunity* **25,** 977–988 (2006).
136. Semerad, C. L. *et al.* G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood* **106,** 3020–3027 (2005).
137. Kiel, M. J., Iwashita, T., Yilmaz, O. H. & Morrison, S. J. Spatial differences in hematopoiesis but not in stem cells indicate a lack of regional patterning in definitive hematopoietic stem cells. *Dev. Biol.* **283,** 29–39 (2005).
138. Ng, S. Y.-M., Yoshida, T., Zhang, J. & Georgopoulos, K. Genome-wide lineage-specific transcriptional networks underscore Ikaros-dependent lymphoid priming in hematopoietic stem cells. *Immunity* **30,** 493–507 (2009).

139. Papathanasiou, P. *et al.* Self-renewal of the long-term reconstituting subset of hematopoietic stem cells is regulated by Ikaros. *Stem Cells Dayt. Ohio* **27,** 3082– 3092 (2009).
140. Poncin, G. *et al.* Characterization of Spontaneous Bone Marrow Recovery after Sublethal Total Body Irradiation: Importance of the Osteoblastic/Adipocytic Balance. *PLOS ONE* **7,** e30818 (2012).
141. Fujisaki, J. *et al.* In vivo imaging of Treg cells providing immune privilege to the haematopoietic stem-cell niche. *Nature* **474,** 216–219 (2011).
142. Yamazaki, S. *et al.* Nonmyelinating Schwann Cells Maintain Hematopoietic Stem Cell Hibernation in the Bone Marrow Niche. *Cell* **147,** 1146–1158 (2011).
143. Irvine, D. A. & Copland, M. Targeting hedgehog in hematologic malignancy. *Blood* **119,** 2196–2204 (2012).
144. Varjosalo, M. & Taipale, J. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev.* **22,** 2454–2472 (2008).
145. Malhotra, S. & Kincade, P. W. Wnt-related molecules and signaling pathway equilibrium in hematopoiesis. *Cell Stem Cell* **4,** 27–36 (2009).
146. Varnum-Finney, B. *et al.* Notch2 governs the rate of generation of mouse long- and short-term repopulating stem cells. *J. Clin. Invest.* **121,** 1207–1216 (2011).
147. Mancini, S. J. C. *et al.* Jagged1-dependent Notch signaling is dispensable for hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood* **105,** 2340–2342 (2005).
148. Parmar, K., Mauch, P., Vergilio, J.-A., Sackstein, R. & Down, J. D. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104,** 5431–5436 (2007).
149. Ito, K. *et al.* Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* **12,** 446–451 (2006).
150. Calvi, L. M. *et al.* Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* **425,** 841–846 (2003).
151. Rodrigues, N. P. *et al.* Haploinsufficiency of GATA-2 perturbs adult hematopoietic stem-cell homeostasis. *Blood* **106,** 477–484 (2005).
152. MacLean, A. L., Lo Celso, C. & Stumpf, M. P. Stem Cell Population Biology: Insights from Haematopoiesis. *STEM CELLS* n/a-n/a (2016). doi:10.1002/stem.2508
153. Cullen, S. M., Mayle, A., Rossi, L. & Goodell, M. A. Hematopoietic stem cell development: an epigenetic journey. *Curr. Top. Dev. Biol.* **107,** 39–75 (2014).
154. Bernstein, E. *et al.* Dicer is essential for mouse development. *Nat. Genet.* **35,** 215–217 (2003).
155. Bissels, U., Bosio, A. & Wagner, W. MicroRNAs are shaping the hematopoietic landscape. *Haematologica* **97,** 160–167 (2012).
156. Roden, C. & Lu, J. MicroRNAs in Control of Stem Cells in Normal and Malignant Hematopoiesis. *Curr. Stem Cell Rep.* **2,** 183–196 (2016).
157. Wojtowicz, E. E. *et al.* Ectopic miR-125a Expression Induces Long-Term Repopulating Stem Cell Capacity in Mouse and Human Hematopoietic Progenitors. *Cell Stem Cell* **19,** 383–396 (2016).
158. **Zhao, J. L., Rao, D. S., O'Connell, R. M., Garcia**-Flores, Y. & Baltimore, D. MicroRNA-146a acts as a guardian of the quality and longevity of hematopoietic stem cells in mice. *eLife* **2,** e00537 (2013).
159. Lazare, S. S., Wojtowicz, E. E., Bystrykh, L. V. & de Haan, G. microRNAs in hematopoiesis. *Exp. Cell Res.* **329,** 234–238 (2014).

160. Ye, X., Wang, X.-B., Wang, J. & Ming, J. [Effect of MicroRNA-146a on Differentiation Potential of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* **24,** 596–601 (2016).
161. Lu, X., Deng, M., He, H., Zeng, D. & Zhang, W. [miR-125b regulates osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells by targeting Smad4]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* **38,** 341–346 (2013).
162. Mizuno, Y. *et al.* miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **368,** 267–272 (2008).
163. Kim, Y. J., Bae, S. W., Yu, S. S., Bae, Y. C. & Jung, J. S. miR-196a regulates proliferation and osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **24,** 816–825 (2009).
164. Pillai, M. M., Yang, X., Balakrishnan, I., Bemis, L. & Torok-Storb, B. MiR-886-3p down regulates CXCL12 (SDF1) expression in human marrow stromal cells. *PloS One* **5,** e14304 (2010).
165. Dore, L. C. *et al.* A GATA-1-regulated microRNA locus essential for erythropoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105,** 3333–3338 (2008).
166. Bianchi, E. *et al.* MYB controls erythroid versus megakaryocyte lineage fate decision through the miR-486-3p-mediated downregulation of MAF. *Cell Death Differ.* **22,** 1906–1921 (2015).
167. Vian, L. *et al.* Transcriptional fine-tuning of microRNA-223 levels directs lineage choice of human hematopoietic progenitors. *Cell Death Differ.* **21,** 290–301 (2014).
168. Nguyen, L. V., Vanner, R., Dirks, P. & Eaves, C. J. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat. Rev. Cancer* **12,** 133–143 (2012).
169. Chen, Y. & Li, S. Molecular signatures of chronic myeloid leukemia stem cells. *Biomark. Res.* **1,** 21 (2013).
170. Chu, S. *et al.* Persistence of leukemia stem cells in chronic myelogenous leukemia patients in prolonged remission with imatinib treatment. *Blood* **118,** 5565–5572 (2011).
171. Grimwade, D. & Enver, T. Acute promyelocytic leukemia: where does it stem from? *Leukemia* **18,** 375–384 (2004).
172. Dick, J. E. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* **112,** 4793–4807 (2008).
173. Chereda, B. & Melo, J. V. Natural course and biology of CML. *Ann. Hematol.* **94 Suppl 2,** S107-121 (2015).
174. Deininger, M. W. N., Goldman, J. M. & Melo, J. V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* **96,** 3343–3356 (2000).
175. Melo, J. V. & Deininger, M. W. N. Biology of chronic myelogenous leukemia--signaling pathways of initiation and transformation. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **18,** 545–568, vii–viii (2004).
176. Faderl, S. *et al.* The Biology of Chronic Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **341,** 164–172 (1999).
177. Hantschel, O. Structure, Regulation, Signaling, and Targeting of Abl Kinases in Cancer. *Genes Cancer* **3,** 436–446 (2012).
178. Ren, R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* **5,** 172–183 (2005).

179. Chen, Y., Peng, C., Sullivan, C., Li, D. & Li, S. Critical molecular pathways in cancer stem cells of chronic myeloid leukemia. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund UK* **24,** 1545–1554 (2010).
180. **O'Shea, J. J., Holland, S. M. & Staudt, L. M. JAKs and STATs in Immunity,** Immunodeficiency, and Cancer. *N. Engl. J. Med.* **368,** 161–170 (2013).
181. Dutta, P. & Li, W. X. in *eLS* (ed. John Wiley & Sons Ltd) (John Wiley & Sons, Ltd, 2013).
182. Hantschel, O. *et al.* BCR-ABL uncouples canonical JAK2-STAT5 signaling in chronic myeloid leukemia. *Nat. Chem. Biol.* **8,** 285–293 (2012).
183. Samanta, A. K. *et al.* Jak2 inhibition deactivates Lyn kinase through the SET-PP2A-SHP1 pathway, causing apoptosis in drug-resistant cells from chronic myelogenous leukemia patients. *Oncogene* **28,** 1669–1681 (2009).
184. Coppo, P. *et al.* BCR-ABL activates STAT3 via JAK and MEK pathways in human cells. *Br. J. Haematol.* **134,** 171–179 (2006).
185. Steelman, L. S. *et al.* JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* **18,** 189–218 (2004).
186. Diaz-Blanco, E. *et al.* Molecular signature of CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cells of patients with CML in chronic phase. *Leukemia* **21,** 494–504 (2007).
187. Jagani, Z., Singh, A. & Khosravi-Far, R. FoxO Tumor Suppressors and BCR-ABL-Induced Leukemia: A Matter of Evasion of Apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1785,** 63–84 (2008).
188. Abraham, S. A. *et al.* Dual targeting of p53 and c-MYC selectively eliminates leukaemic stem cells. *Nature* **534,** 341–346 (2016).
189. Neviani, P. *et al.* The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein. *Cancer Cell* **8,** 355–368 (2005).
190. Schepers, K., Campbell, T. B. & Passegué, E. Normal and Leukemic Stem Cell Niches: Insights and Therapeutic Opportunities. *Cell Stem Cell* **16,** 254–267 (2015).
191. Nwajei, F. & Konopleva, M. The Bone Marrow Microenvironment as Niche Retreats for Hematopoietic and Leukemic Stem Cells. *Adv. Hematol.* **2013,** (2013).
192. Bruns, I. *et al.* The hematopoietic stem cell in chronic phase CML is characterized by a transcriptional profile resembling normal myeloid progenitor cells and reflecting loss of quiescence. *Leukemia* **23,** 892–899 (2009).
193. Jin, L. *et al.* CXCR4 up-regulation by imatinib induces chronic myelogenous leukemia (CML) cell migration to bone marrow stroma and promotes survival of quiescent CML cells. *ResearchGate* **7,** 48–58 (2008).
194. Dierks, C. *et al.* Expansion of Bcr-Abl-positive leukemic stem cells is dependent on Hedgehog pathway activation. *Cancer Cell* **14,** 238–249 (2008).
195. Radich, J. P. *et al.* Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103,** 2794– 2799 (2006).
196. Sengupta, A. *et al.* Deregulation and cross talk among Sonic hedgehog, Wnt, Hox and Notch signaling in chronic myeloid leukemia progression. *Leukemia* **21,** 949–955 (2007).
197. Herrmann, H. *et al.* Dipeptidylpeptidase IV (CD26) defines leukemic stem cells (LSC) in chronic myeloid leukemia. *Blood* **123,** 3951–3962 (2014).

198. Kinstrie, R. *et al.* CD93 Is a Novel Biomarker of Leukemia Stem Cells in Chronic Myeloid Leukemia. *Blood* **126,** 49–49 (2015).
199. Gerber, J. M. *et al.* Genome-wide comparison of the transcriptomes of highly enriched normal and chronic myeloid leukemia stem and progenitor cell populations. *Oncotarget* **4,** 715–728 (2013).
200. Sadovnik, I. *et al.* Identification of CD25 as STAT5-Dependent Growth Regulator of Leukemic Stem Cells in Ph+ CML. *Clin. Cancer Res.* **22,** 2051–2061 (2016).
201. Venturini, L. *et al.* Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34+ cells. *Blood* **109,** 4399–4405 (2007).
202. Fallah, P. *et al.* Expression pattern of key microRNAs in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Int. J. Lab. Hematol.* **37,** 560–568 (2015).
203. Machová Poláková, K. *et al.* Expression patterns of microRNAs associated with CML phases and their disease related targets. *Mol. Cancer* **10,** 41 (2011).
204. Wang, W.-Z. *et al.* Silencing of miR-21 sensitizes CML CD34+ stem/progenitor cells to imatinib-induced apoptosis by blocking PI3K/AKT pathway. *Leuk. Res.* **39,** 1117–1124 (2015).
205. Agirre, X. *et al.* Down-regulation of hsa-miR-10a in chronic myeloid leukemia CD34+ cells increases USF2-mediated cell growth. *Mol. Cancer Res. MCR* **6,** 1830–1840 (2008).
206. Flamant, S. *et al.* Micro-RNA response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica* **95,** 1325–1333 (2010).
207. Flamant, S. *et al.* Micro-RNA response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica* **95,** 1325–1333 (2010).
208. Xu, L. *et al.* Altered expression pattern of miR-29a, miR-29b and the target genes in myeloid leukemia. *Exp. Hematol. Oncol.* **3,** 17 (2014).
209. Li, Z. *et al.* Biological functions of miR-29b contribute to positive regulation of osteoblast differentiation. *J. Biol. Chem.* **284,** 15676–15684 (2009).
210. San José-Enériz, E. *et al.* MicroRNA expression profiling in Imatinib-resistant Chronic Myeloid Leukemia patients without clinically significant ABL1-mutations. *Mol. Cancer* **8,** 69 (2009).
211. Ali, M. A. M. Chronic Myeloid Leukemia in the Era of Tyrosine Kinase Inhibitors: An Evolving Paradigm of Molecularly Targeted Therapy. *Mol. Diagn. Ther.* **20,** 315–333 (2016).
212. **Eide, C. A. & O'Hare, T. Chronic myeloid leukemia: advances in understanding** disease biology and mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* **10,** 158–166 (2015).
213. Shah, K., Parikh, S. & Rawal, R. Tyrosine Kinase Inhibitors in Ph+ Chronic Myeloid Leukemia Therapy: a Review. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* **17,** 3025–3033 (2016).
214. Miller, G. D., Bruno, B. J. & Lim, C. S. Resistant mutations in CML and Ph+ALL – role of ponatinib. *Biol. Targets Ther.* **8,** 243–254 (2014).
215. Branford, S. *et al.* High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. *Blood* **99,** 3472–3475 (2002).
216. Eiring, A. M. *et al.* Combined STAT3 and BCR-ABL1 inhibition induces synthetic lethality in therapy-resistant chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **29,** 586–597 (2015).

217. Jørgensen, H. G., Allan, E. K., Jordanides, N. E., Mountford, J. C. & Holyoake, T. L. Nilotinib exerts equipotent antiproliferative effects to imatinib and does not induce apoptosis in CD34+ CML cells. *Blood* **109,** 4016–4019 (2007).
218. Corbin, A. S. *et al.* Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *J. Clin. Invest.* **121,** 396–409 (2011).
219. Dulucq, S. & Mahon, F.-X. Deep molecular responses for treatment-free remission in chronic myeloid leukemia. *Cancer Med.* **5,** 2398–2411 (2016).
220. Mahon, F.-**X. Discontinuation of TKI therapy and „functional" cure for CML.** *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **29,** 308–313 (2016).
221. Lu, J. *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435,** 834–838 (2005).
222. Chaubey, A. *et al.* MicroRNAs and deletion of the derivative chromosome 9 in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **23,** 186–188 (2009).
223. Yu, Y. *et al.* microRNA 30A promotes autophagy in response to cancer therapy. *Autophagy* **8,** 853–855 (2012).
224. Liu, L. *et al.* Myc induced miR-144/451 contributes to the acquired imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia cell K562. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **425,** 368–373 (2012).
225. Chakraborty, C. *et al.* MicroRNAs mediated regulation of MAPK signaling pathways in chronic myeloid leukemia. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.7977
226. Wang, L.-S. *et al.* MicroRNA-486 regulates normal erythropoiesis and enhances growth and modulates drug response in CML progenitors. *Blood* **125,** 1302–1313 (2015).
227. Jacquel, A. *et al.* Imatinib induces mitochondria-dependent apoptosis of the Bcr-Abl-positive K562 cell line and its differentiation toward the erythroid lineage. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **17,** 2160–2162 (2003).
228. Rasmussen, K. D. *et al.* The miR-144/451 locus is required for erythroid homeostasis. *J. Exp. Med.* **207,** 1351–1358 (2010).
229. Choong, M. L., Yang, H. H. & McNiece, I. MicroRNA expression profiling during human cord blood-derived CD34 cell erythropoiesis. *Exp. Hematol.* **35,** 551–564 (2007).
230. Huang, X. *et al.* Regulated expression of microRNAs-126/126* inhibits erythropoiesis from human embryonic stem cells. *Blood* **117,** 2157–2165 (2011).
231. Kumarswamy, R., Volkmann, I. & Thum, T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. *RNA Biol.* **8,** 706–713 (2011).
232. Mullokandov, G. *et al.* High-throughput assessment of microRNA activity and function using microRNA sensor and decoy libraries. *Nat. Methods* **9,** 840–846 (2012).
233. Davis, B. N., Hilyard, A. C., Lagna, G. & Hata, A. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* **454,** 56–61 (2008).
234. Fujita, S. *et al.* miR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism. *J. Mol. Biol.* **378,** 492–504 (2008).
235. Shuai, K., Halpern, J., ten Hoeve, J., Rao, X. & Sawyers, C. L. Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene* **13,** 247–254 (1996).
236. Barnes, N. A., Stephenson, S., Cocco, M., Tooze, R. M. & Doody, G. M. BLIMP-1 and STAT3 counterregulate microRNA-21 during plasma cell differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **189,** 253–260 (2012).

237. Feuermann, Y., Kang, K., Shamay, A., Robinson, G. W. & Hennighausen, L. MiR-21 is under control of STAT5 but is dispensable for mammary development and lactation. *PloS One* **9,** e85123 (2014).
238. Lindahl, L. M. *et al.* STAT5 induces miR-21 expression in cutaneous T cell lymphoma. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.10160
239. Löffler, D. *et al.* Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. *Blood* **110,** 1330–1333 (2007).
240. Yang, X.-P. *et al.* Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5. *Nat. Immunol.* **12,** 247–254 (2011).
241. Hantschel, O. *et al.* BCR-ABL uncouples canonical JAK2-STAT5 signaling in chronic myeloid leukemia. *Nat. Chem. Biol.* **8,** 285–293 (2012).
242. Sillaber, C., Gesbert, F., Frank, D. A., Sattler, M. & Griffin, J. D. STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells. *Blood* **95,** 2118–2125 (2000).
243. Nelson, E. A. *et al.* The STAT5 inhibitor pimozide decreases survival of chronic myelogenous leukemia cells resistant to kinase inhibitors. *Blood* **117,** 3421–3429 (2011).
244. Casetti, L. *et al.* Differential contributions of STAT5A and STAT5B to stress protection and tyrosine kinase inhibitor resistance of chronic myeloid leukemia stem/progenitor cells. *Cancer Res.* **73,** 2052–2058 (2013).
245. Xiong, L. *et al.* Global proteome quantification for discovering imatinib-induced perturbation of multiple biological pathways in K562 human chronic myeloid leukemia cells. *J. Proteome Res.* **9,** 6007–6015 (2010).
246. Lankat-Buttgereit, B. & Göke, R. The tumour suppressor Pdcd4: recent advances in the elucidation of function and regulation. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* **101,** 309–317 (2009).
247. Lu, Z. *et al.* MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene* **27,** 4373–4379 (2008).
248. Ran, F. A. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* **8,** 2281–2308 (2013).
249. Spiekermann, K., Bagrintseva, K., Schwab, R., Schmieja, K. & Hiddemann, W. Overexpression and constitutive activation of FLT3 induces STAT5 activation in primary acute myeloid leukemia blast cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **9,** 2140–2150 (2003).
250. Jongen-Lavrencic, M., Sun, S. M., Dijkstra, M. K., Valk, P. J. M. & Löwenberg, B. MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia. *Blood* **111,** 5078–5085 (2008).
251. Li, Y. *et al.* Anti-miR-21 oligonucleotide sensitizes leukemic K562 cells to arsenic trioxide by inducing apoptosis. *Cancer Sci.* **101,** 948–954 (2010).
252. Hu, H. *et al.* Antisense oligonucleotide against miR-21 inhibits migration and induces apoptosis in leukemic K562 cells. *Leuk. Lymphoma* **51,** 694–701 (2010).
253. Zhou, M. *et al.* Histone demethylase RBP2 decreases miR-21 in blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Oncotarget* **6,** 1249–1261 (2015).
254. Warsch, W. *et al.* High STAT5 levels mediate imatinib resistance and indicate disease progression in chronic myeloid leukemia. *Blood* **117,** 3409–3420 (2011).
255. Simon, R. *et al.* Analysis of Gene Expression Data Using BRB-Array Tools. *Cancer Inform.* **3,** 11–17 (2007).

256. Costaglioli, P. *et al.* Evidence for the involvement of the anthranilate degradation pathway in Pseudomonas aeruginosa biofilm formation. *MicrobiologyOpen* **1,** 326–339 (2012).
257. Käll, L., Canterbury, J. D., Weston, J., Noble, W. S. & MacCoss, M. J. Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nat. Methods* **4,** 923–925 (2007).
258. Ason, B. *et al.* Differences in vertebrate microRNA expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103,** 14385–14389 (2006).
259. Shi, J. Considering Exosomal miR-21 as a Biomarker for Cancer. *J. Clin. Med.* **5,** 42 (2016).
260. Ribas, J. & Lupold, S. E. The transcriptional regulation of miR-21, its multiple transcripts, and their implication in prostate cancer. *Cell Cycle Georget. Tex* **9,** 923–929 (2010).
261. Davis-Dusenbery, B. N. & Hata, A. MicroRNA in Cancer The Involvement of Aberrant MicroRNA Biogenesis Regulatory Pathways. *Genes Cancer* **1,** 1100–1114 (2010).
262. Loboda, A., Sobczak, M., Jozkowicz, A. & Dulak, J. TGF-β1/Smads and miR-21 in Renal Fibrosis and Inflammation. *Mediators Inflamm.* **2016,** e8319283 (2016).
263. Lai, P.-S. *et al.* A STAT inhibitor patent review: progress since 2011. *Expert Opin. Ther. Pat.* **25,** 1397–1421 (2015).
264. Casetti, L. *New roles of STAT5 factors in chronic myeloid leukemia cell maintenance*. (Paris 5, 2013).
265. Yu, H., Lee, H., Herrmann, A., Buettner, R. & Jove, R. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nat. Rev. Cancer* **14,** 736–746 (2014).
266. Wang, G., Wang, J. J., Tang, H. M. & To, S. S. T. Targeting strategies on miRNA-21 and PDCD4 for glioblastoma. *Arch. Biochem. Biophys.* **580,** 64–74 (2015).
267. Ma, J., Liu, S. & Wang, Y. MicroRNA-21 and multiple myeloma: small molecule and big function. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* **31,** 94 (2014).
268. van der Fits, L. *et al.* MicroRNA-21 expression in CD4+ T cells is regulated by STAT3 and is pathologically involved in Sézary syndrome. *J. Invest. Dermatol.* **131,** 762–768 (2011).
269. Weber, A. *et al.* Stat5 Exerts Distinct, Vital Functions in the Cytoplasm and Nucleus of Bcr-Abl+ K562 and Jak2(V617F)+ HEL Leukemia Cells. *Cancers* **7,** 503–537 (2015).
270. Wickramasinghe, N. S. *et al.* Estradiol downregulates miR-21 expression and increases miR-21 target gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *Nucleic Acids Res.* **37,** 2584–2595 (2009).
271. Jazbutyte, V. & Thum, T. MicroRNA-21: From Cancer to Cardiovascular Disease. *Curr. Drug Targets* **11,** 926–935 (2010).
272. Hatley, M. E. *et al.* Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21. *Cancer Cell* **18,** 282–293 (2010).
273. Schafranek, L. *et al.* Sustained inhibition of STAT5, but not JAK2, is essential for TKI-induced cell death in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **29,** 76–85 (2015).
274. Berger, A., Sexl, V., Valent, P. & Moriggl, R. Inhibition of STAT5: a therapeutic option in BCR-ABL1-driven leukemia. *Oncotarget* **5,** 9564–9576 (2014).

275. Yao, Q., Xu, H., Zhang, Q.-Q., Zhou, H. & Qu, L.-H. MicroRNA-21 promotes cell proliferation and down-regulates the expression of programmed cell death 4 (PDCD4) in HeLa cervical carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **388,** 539–542 (2009).
276. Asangani, I. A. *et al.* MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* **27,** 2128–2136 (2008).
277. Chen, Y. *et al.* MicroRNA-21 down-regulates the expression of tumor suppressor PDCD4 in human glioblastoma cell T98G. *Cancer Lett.* **272,** 197–205 (2008).
278. Dixit, A. K. *et al.* Comprehensive analysis of microRNA signature of mouse pancreatic acini: over-expression of miR-21-3p in acute pancreatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* ajpgi.00191.2016 (2016). doi:10.1152/ajpgi.00191.2016
279. Sicard, F., Gayral, M., Lulka, H., Buscail, L. & Cordelier, P. Targeting miR-21 for the therapy of pancreatic cancer. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **21,** 986– 994 (2013).
280. Folini, M. *et al.* miR-21: an oncomir on strike in prostate cancer. *Mol. Cancer* **9,** 12 (2010).
281. Jackerott, M. *et al.* STAT5 activity in pancreatic beta-cells influences the severity of diabetes in animal models of type 1 and 2 diabetes. *Diabetes* **55,** 2705–2712 (2006).
282. Bhatia, R. *et al.* Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment. *Blood* **101,** 4701–4707 (2003).
283. Deininger, M. W. Diagnosing and managing advanced chronic myeloid leukemia. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book ASCO Am. Soc. Clin. Oncol. Meet.* e381-388 (2015). doi:10.14694/EdBook_AM.2015.35.e381
284. Gerber, J. M. *et al.* Characterization of chronic myeloid leukemia stem cells. *Am. J. Hematol.* **86,** 31–37 (2011).
285. Dvorak, A. M. *et al.* Vesicular transport of Charcot-Leyden crystal protein in f-Met peptide-stimulated human basophils. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **113,** 465– 477 (1997).
286. Qiu, Z., Dyer, K. D., Xie, Z., Rådinger, M. & Rosenberg, H. F. GATA transcription factors regulate the expression of the human eosinophil-derived neurotoxin (RNase 2) gene. *J. Biol. Chem.* **284,** 13099–13109 (2009).
287. Zhou, H. *et al.* Growth Arrest Specific 2 Is Up-Regulated in Chronic Myeloid Leukemia Cells and Required for Their Growth. *PLoS ONE* **9,** (2014).
288. Landberg, N. *et al.* IL1RAP expression as a measure of leukemic stem cell burden at diagnosis of chronic myeloid leukemia predicts therapy outcome. *Leukemia* **30,** 253–257 (2016).
289. Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K.-J. & Baltimore, D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103,** 12481– 12486 (2006).
290. Xiao, C. *et al.* MiR-150 Controls B Cell Differentiation by Targeting the Transcription Factor c-Myb. *Cell* **165,** 1027 (2016).
291. He, Y., Jiang, X. & Chen, J. The role of miR-150 in normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene* **33,** 3887–3893 (2014).

292. Morris, V. A. *et al.* MicroRNA-150 Expression Induces Myeloid Differentiation of Human Acute Leukemia Cells and Normal Hematopoietic Progenitors. *PLOS ONE* **8,** e75815 (2013).
293. Basova, P. *et al.* Aggressive acute myeloid leukemia in PU.1/p53 double-mutant mice. *Oncogene* **33,** 4735–4745 (2014).
294. **O'Connell, R. M., Zhao, J. L. & Rao, D. S. MicroRNA function in myeloid** biology. *Blood* **118,** 2960–2969 (2011).
295. Wang, W., Kong, T., Zhang, D., Zhang, J. & Cheng, G. Label-Free MicroRNA Detection Based on Fluorescence Quenching of Gold Nanoparticles with a Competitive Hybridization. *Anal. Chem.* **87,** 10822–10829 (2015).
296. Yoo, B. *et al.* In Vivo Detection of miRNA Expression in Tumors Using an Activatable Nanosensor. *Mol. Imaging Biol.* **18,** 70–78 (2016).